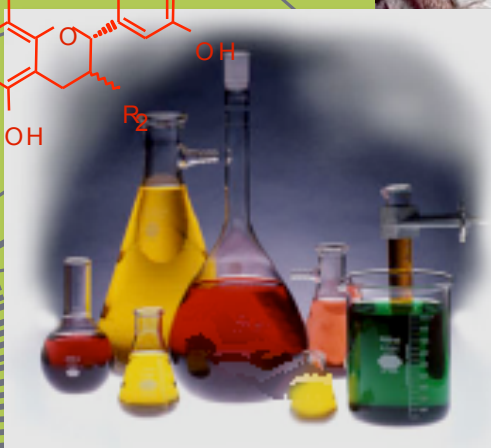
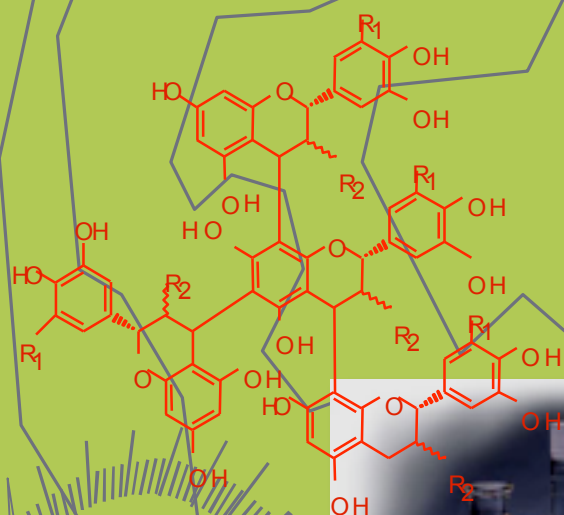


DISEÑO DE INGREDIENTES ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL Y SU APLICACIÓN EN LA ESTABILIZACIÓN DE PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA



JACOBO IGLESIAS NEIRA

Memoria para optar al grado de Doctor
Santiago de Compostela, Marzo de 2009

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología.



**DISEÑO DE INGREDIENTES ANTIOXIDANTES DE ORIGEN
NATURAL Y SU APLICACIÓN EN LA ESTABILIZACIÓN DE
PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA**

por

Jacobo Iglesias Neira

Tesis doctoral

2009

D. Alberto Cepeda Sáez, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informa:

Que D. Jacobo Iglesias Neira ha realizado, bajo la tutoría del Dr. Isaac Rodríguez Pereiro, perteneciente a este departamento, y bajo la inmediata dirección de la Da. María Isabel Medina Méndez en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo C.S.I.C., el trabajo **“Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca”** que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, a 10 de Marzo de 2009.

D. Alberto Cepeda Sáez

D. Isaac Rodriguez Pereiro, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

Informa:

Que la memoria adjunta titulada, “**Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca**”, que para optar al grado de Doctor en Química presenta D. Jacobo Iglesias Neira, ha sido realizada bajo la inmediata dirección de la Dra. María Isabel Medina Méndez en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo C.S.I.C.

Y considerando que constituye trabajo de tesis, autoriza su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expido el presente certificado en Santiago de Compostela, a 10 de Marzo de 2009.

D. Isaac Rodriguez Pereiro

Da. María Isabel Medina Méndez, Investigadora Científica del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo C.S.I.C.

Autoriza:

La presentación de la memoria adjunta titulada, “**Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca**”, realizada bajo mi inmediata dirección en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo C.S.I.C., que para optar al grado de Doctor en Química presenta D. Jacobo Iglesias Neira.

Y considerando que constituye trabajo de tesis, autoriza su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que conste, expido el presente certificado en Vigo, a 10 de Marzo de 2009.

Da. María Isabel Medina Méndez

Agradecimientos

Resultará difícil olvidar todos los momentos vividos en los cuatro años invertidos en esta etapa tan importante de mi vida. En mi memoria quedarán grabados para siempre los cafés de las 11 y media en la asociación, las “pachangas”, las conversaciones sin sentido en el despacho, las comidas en la cafetería, las cañas en el Falucho, o las carreras hacia la sala de cromatografía precedidas por el inconfundible pitido del cronómetro. Pero sin duda, con lo que me quedará será con las personas que han compartido conmigo esos momentos o que de una u otra forma han hecho posible su realización. El hecho de que esta vaya a ser la sección más leída de mi tesis doctoral, hace que no resulte fácil llevar a cabo su redacción ya que no me gustaría olvidar a nadie. Bien es cierto que incluir a toda la gente que me ha acompañado en este camino, requeriría un nuevo tomo de la memoria. Por ello, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento, de antemano, a todos los que tras leer estas líneas sientan que han contribuido a esta etapa de mi vida, tanto desde el punto de vista personal como profesional, aunque no encontréis vuestro nombre escrito en este papel. Gracias, muchas gracias.

Mi inmensa gratitud hacia la directora de esta tesis, Isabel Medina, sólo puede reflejarse de manera muy pobre en estas pocas líneas. Gracias por elegirme y confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Gracias por tu valiosa dirección, tu paciencia, por la resolución de tantas y tantas dudas, por tus brillantes ideas y por dirigir mi trabajo hasta esta meta. Tu capacidad de trabajo, tu motivación, y tesón serán, sin duda, un referente para mí en el futuro. Muchas gracias.

Me gustaría dar las gracias al Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (IIM-CSIC), por facilitarme la utilización de sus instalaciones. Asimismo, quiero agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyectos PPQ2003-06602 C04-03 y AGL-2006-12210-C03-01) y al proyecto de investigación integrado SEAFOODplus (FOOD-CT-2004-506359) la financiación de este trabajo. Por último, me gustaría agradecer al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) la concesión de la beca predoctoral I3P para la realización de esta tesis.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a José Manuel Gallardo por su constante apoyo y asesoramiento en muchos aspectos de la investigación y elaboración de esta tesis. Gracias por tus consejos, tanto desde el punto de vista académico como personal, y por las largas charlas sobre economía y política, de las que tanto he aprendido en la recta final de este camino.

Gracias a Isaac Rodríguez y a Rafael Cela, por concederme la primera oportunidad de participar en el apasionante mundo de la investigación. Sin duda, sois en parte responsables de que esté escribiendo estas líneas y de lo que ello supone. Gracias Isaac por transmitirme una ínfima parte de tus conocimientos, por tu paciencia conmigo y los “malditos” bromofenoles, y por estar dispuesto en todo momento a resolver mis dudas tanto durante mi estancia en el Instituto de Investigación y Análisis Alimentario como en mis etapas posteriores.

También me complace agradecer el apoyo y los medios recibidos en los distintos centros donde he desarrollado parte de mi doctorado. Gracias a la Dra. Federica Bianchi del Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica de la Università degli Studi di Parma por su apoyo y su docencia durante mi estancia en su laboratorio. De la misma forma, quiero mostrar mi más profundo agradecimiento al Prof. Franz Bucar por su acogida tan calurosa en el Department of Pharmacognosy del Institute for Pharmaceutical Sciences de la Universidad de Graz.

Por supuesto, no puedo olvidar a todos los compañeros y amigos que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos cuatro años, con los cuales he compartido horas de trabajo, despacho y alguna que otra noche de copas, y de los cuales obviaré la mayoría de los nombres para no olvidarme de ninguno. Vosotros sabéis perfectamente quienes sois. Gracias a todos por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Sin embargo, debo hacer una mención especial a Chus y a Salomé. Esta tesis no podría haberse llevado a cabo sin vuestro apoyo y ayuda, por lo que espero que la veáis, en parte, como vuestra. Gracias a mi antecesor, Manu, por aplicar tu experiencia en la resolución de tantas y tantas de mis dudas, y a mi predecesor, Rodri, por tu ayuda con la hemoglobina y tu característico humor (a pesar de la rana y la lagartija). Gracias Marcos, compañero de poyata durante todos estos años, por ayudarme a

sobrellevar muchas mañanas con tu humor, tu hipoteca y tus lecciones magistrales de Kiiiite!!!. Gracias Mónica por tu amistad que no tiene precio, además de tu sinceridad, confianza y tu contagiosa motivación por la investigación que, estoy seguro, te llevará muy lejos. Espero volver a coincidir contigo en algún laboratorio de cualquier parte del mundo.

Quiero agradecer a todas las personas que, aun sin saberlo, han contribuido en numerosas ocasiones a la realización de esta tesis, ayudándome a olvidarla durante unas horas. Gracias a “los de Santiago” por seguir siendo los amigos de toda la vida y por hacerme desear tantas veces la llegada del viernes. Gracias a “los de Bouzas” por ayudarme a desconectar del trabajo siempre que lo he necesitado y compartir conmigo tantas horas de cañas y pinball. Gracias a Cris, Pauli, Gali, Víctor y Nacho por vuestro alegría y los numerosos buenos momentos que me habéis brindado durante estos años.

Esta tesis está dedicada a mis padres y hermanos a quienes agradezco de todo corazón su apoyo y comprensión tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias a vosotros soy quien soy y he llegado a donde estoy. Esta tesis también es vuestra tesis. Gracias de todo corazón.

Simplemente gracias, Eva. Gracias por ser mi apoyo y comprensión, por tu ánimo y paciencia. Gracias por preocuparte por mí y por mi trabajo, incluso más que por el tuyo. Gracias por haberme acompañado y ayudado durante todos los días de esta etapa de mi vida, y por los que quedan. En definitiva, gracias por ser la mejor. Gracias, gracias, muchas gracias.

Símbolos y abreviaturas

λ	longitud de onda
α -TOH	α -tocoferol
AA	ácido ascórbico
AA \cdot	radical ascorbilo
ADP	adenosín difosfato
AEDA	análisis de dilución de extracto
AEDT	ácido etilendiamintetraacético
ARA	ácido araquidónico
ATP	adenosín trifosfato
BHA	butilhidroxianisol
BHT	butilhidroxitolueno
Caf-OH	ácido cafeico
CE	electroforesis capilar
COX	ciclooxigenasa
DAD	detector de diodos
desoxiHb	desoxihemoglobina
DHA	ácido docosahexanoico
DHAA	ácido dehidroascórbico
DHS	espacio de cabeza dinámico
DMPD	4,5-dimetil-1,2-fenilendiamina
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DPA	ácido docosapentanoico
EPA	ácido eicosapentanoico
eV	electrón-voltio
Fe-LMW	hierro de bajo peso molecular
FID	detector de ionización de llama
g	gramo
GC	cromatografía de gases
GSH	glutathiona
GSSG	glutathiona oxidada
Hb	hemoglobina
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HS	espacio de cabeza
IP	Fracción I de pino
IS	estándar interno
IVH	fracción iv de Hamamelis
IVP	fracción iv de pino

IVU	fracción iv de uva
IXP	fracción ix de pino
Kcal	kilocalorías
Kg	kilogramo
KPa	kilopascuales
L	litro
LDL	lipoproteína de baja densidad
LOQs	límites de cuantificación
LOX	lipoxigenasa
m/z	relación masa/carga
MDA	malondialdehído
metHb	metahemoglobina
mg	miligramo
min	minuto
mm	milímetro
mM	milimolar
MS	espectrometría de masas
NADH	nicotiamida-adenina dinucleotido
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
ng	nanogramo
°C	grado centígrado
OPDA	1,2-fenilendiamina
OTMA	óxido de trimetilamina
OWP	fracción total de pino
OWU	fracción total de uva
oxiHb	oxihemoglobina
PFBHA	o-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil) hidroxilamina
PFPH	pentafluorofenilhidrazina
PG	propilgalato
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
ppt	partes por trillón
Pre-RP-HPLC	cromatografía líquida preparativa de alta resolución en fase reversa
PTV	vaporizador de temperatura programable
PUFA	ácido graso poliinsaturado
PV	índice de peróxidos
QH	ubiquinona
r.p.m.	revoluciones por minuto
RNS	sustancias reactivas de nitrógeno
ROS	sustancias reactivas de oxígeno

RSD	desviación estándar relativa
s	segundo
S/N	relación señal/ruído
SDE	destilación-extracción simultánea con disolventes
SDS	dodecil sulfato sódico
SFC	cromatografía de fluidos supercríticos
SFE	extracción con fluidos supercríticos
SHS	espacio de cabeza estático
SIM	monitorización de iones seleccionados
SOD	superóxido dismutasa
SPME	microextracción en fase sólida
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	índice del ácido tiobarbitúrico
TBHQ	terbutilhidroquinona
TCA	ácido tricloroacético
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
V	voltio
XIH	fracción xi de Hamamelis
XIP	fracción xi de pino
XP	fracción x de pino
μA	microamperios
μg	microgramos
μm	micrometros
μmol	micromoles

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. ALIMENTOS DERIVADOS DE LOS PRODUCTOS DE LA PESCA. VENTAJAS E INCONVENIENTES	7
2. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA	10
2.1. CAMBIOS POST-MORTEM PRODUCIDOS EN EL MÚSCULO DE PESCADO	12
2.2. MECANISMOS DE OXIDACIÓN LIPÍDICA	14
2.2.1. Etapa de iniciación	14
2.2.2. Etapa de propagación	15
2.2.3. Etapa de terminación	15
2.3. MECANISMOS DE APARICIÓN DE RADICALES LIBRES LIPÍDICOS.	16
2.4. FORMACIÓN DE PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA	17
2.4.1. Volátiles formados mediante el mecanismo de autooxidación.	18
2.4.2. Volátiles formados mediante catálisis enzimática	24
3. BALANCE REDOX EN EL MÚSCULO DE PESCADO POST MORTEM	28
3.1. COMPONENTES CATALIZADORES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL MÚSCULO DE PESCADO	29
3.1.1. Componentes enzimáticos	30
3.1.2. Componentes no enzimáticos	30
3.2. SISTEMA ANTIOXIDANTE ENDÓGENO	34
3.2.1. Antioxidantes enzimáticos	35
3.2.2. Antioxidantes endógenos no enzimáticos	37
4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA EXTENSIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES	43
4.1. GENERALIDADES	43
4.2. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES PARA EL SEGUIMIENTO DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA.	46
4.2.1. Técnicas de extracción y concentración	46
4.2.2. Técnicas de análisis e identificación	54
5. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y RETARDO DE LA OXIDACIÓN. ADICIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.	56

5.1.	CONTROL DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE LA ADICIÓN DE SUSTANCIAS	
	ANTIOXIDANTES	57
5.1.1.	Antioxidantes sintéticos	60
5.1.2.	Antioxidantes naturales	61
5.2.	RESIDUOS INDUSTRIALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES: BAGAZO DE UVA, CORTEZA DE PINO Y CORTEZA DE HAMAMELIS	71
5.2.1.	Bagazo de uva (<i>Vitis vinifera</i>)	72
5.2.2.	Corteza de pino (<i>Pinus pinaster</i>)	73
5.2.3.	Corteza de Hamamelis (<i>Hamamelis virginiana</i>)	74
6.	BIBLIOGRAFÍA	76

CAPÍTULO 1 : DESARROLLO ANALÍTICO **89**

1.1.	DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN MÚSCULO DE PESCADO	91
1.1.1.	INTRODUCCIÓN	91
1.1.2.	EXPERIMENTAL	94
1.1.2.1.	Materiales e Instrumentación	94
1.1.2.2.	Preparación de disoluciones	95
1.1.2.3.	Metodologías	96
1.1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
1.1.3.1.	Optimización del método	99
1.1.3.2.	Validación	103
1.1.3.3.	Aplicación a muestras reales	106
1.2.	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PROCEDENTES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN EMULSIONES ENRIQUECIDAS EN ACEITE DE PESCADO	109
1.2.1.	INTRODUCCIÓN	109
1.2.2.	EXPERIMENTAL	111
1.2.2.1.	Materiales e Instrumentación	111
1.2.2.2.	Metodologías	113
1.2.2.3.	Análisis estadístico	119
1.2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
1.2.3.1.	Optimización del método	120
1.2.3.2.	Validación	132

1.2.3.3. Seguimiento de la oxidación lipídica en muestras enriquecidas en aceite de pescado mediante el análisis de volátiles.	135
1.2.4. CONCLUSIONES	142
1.3.DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PROCEDENTES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN MÚSCULO DE PESCADO	143
1.3.1. INTRODUCCIÓN	143
1.3.2. EXPERIMENTAL	145
1.3.2.1. Pescado	145
1.3.2.2. Disolventes, reactivos y gases	145
1.3.2.3. Patrones	146
1.3.2.4. Materiales	146
1.3.2.5. Instrumentación	146
1.3.2.6. Evaluación de la influencia de los factores volumen de muestra, tiempo de incubación y temperatura de extracción en la eficacia de la HS-SPME. Diseño experimental.	147
1.3.2.7. Extracción de lípidos totales.	148
1.3.2.8. Contenido total de grasa	149
1.3.2.9. Análisis de los ácidos grasos	149
1.3.2.10. Análisis sensorial	149
1.3.2.11. Índice de peróxidos (PV).	149
1.3.2.12. Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS)	150
1.3.2.13. Determinación de volátiles.	150
1.3.2.14. Análisis estadístico	151
1.3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	152
1.3.3.1. Optimización del método	152
1.3.3.2. Validación	161
1.3.3.3. Seguimiento de la oxidación lipídica en músculo de pescado mediante el análisis de volátiles.	162
1.3.4. CONCLUSIONES	166
1.4.DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE HS-SPME CON DERIVATIZACIÓN EN FIBRA.	167
1.4.1. INTRODUCCIÓN	167
1.4.2. EXPERIMENTAL	169
1.4.2.1. Muestras de pescado	169
1.4.2.2. Disolventes, reactivos y gases	169

1.4.2.3.	Patrones	169
1.4.2.4.	Materiales	169
1.4.2.5.	Extracción de volátiles del músculo.	170
1.4.2.6.	Extracción y derivatización en la superficie de la fibra.	170
1.4.2.7.	Extracción de lípidos totales.	172
1.4.2.8.	Contenido total de grasa	172
1.4.2.9.	Análisis de los ácidos grasos	173
1.4.2.10.	Análisis estadístico	173
1.4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	174
1.4.3.1.	Optimización del método	174
1.4.3.2.	Validación	186
1.4.3.3.	Aplicación a la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de pescado de distintas especies y sometidas a diferentes tratamientos tecnológicos.	188
1.4.4.	CONCLUSIONES	194
1.5.	CONCLUSIONES	195
1.6.	BIBLIOGRAFÍA	198
1.7.	ANEXO I.	204

CAPÍTULO 2 : APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA PESCA Y MECANISMOS QUE RIGEN SU ACTIVIDAD

217

2.1.	INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	219
2.1.1.	INTRODUCCIÓN	219
2.1.2.	EXPERIMENTAL	221
2.1.2.1.	Sustrato lipídico	221
2.1.2.2.	Antioxidantes	221
2.1.2.3.	Determinación de la eficacia antioxidante en emulsiones de aceite de pescado en agua.	226
2.1.2.4.	Determinación de la eficacia antioxidante en músculo de pescado.	229
2.1.2.5.	Análisis estadístico	232
2.1.3.	RESULTADOS	233

2.1.3.1. Actividad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos en la inhibición de la oxidación lipídica en músculo de pescado.	233
2.1.3.2. Estudio de la actividad antioxidante en función de la estructura molecular en fracciones polifenólicas procedentes de residuos naturales.	237
2.1.4. DISCUSIÓN	252
2.1.4.1. Efectividad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos.	252
2.1.4.2. Influencia del grado de polimerización y el porcentaje de galoización en la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas.	254
2.1.5. CONCLUSIONES	257
2.2.INTERACCIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES CON EL SISTEMA ENDÓGENO PROOXIDANTE/ANTIOXIDANTE DEL MÚSCULO DE PESCADO.	259
2.2.1. INTRODUCCIÓN	259
2.2.1. EXPERIMENTAL	262
2.2.1.1. Material	262
2.2.1.2. Métodos	263
2.2.1.3. Análisis estadístico.	270
2.2.2. RESULTADOS	271
2.2.2.1. Estudio del mecanismo de inhibición de la oxidación lipídica. Interacciones entre los aditivos naturales y el sistema antioxidante endógeno del músculo.	271
2.2.2.2. Interacción de las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis con el sistema prooxidante endógeno del músculo. La Hemoglobina.	280
2.2.3. DISCUSIÓN	293
2.2.4. CONCLUSIONES	303
2.3.BIBLIOGRAFÍA	304
 CONCLUSIONES GENERALES	 309



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El consumo de alimentos funcionales ha aumentado en los últimos años tanto en Europa como en Estados Unidos. Entre éstos, destaca el creciente interés por el consumo de alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), en concreto del tipo ω -3, debido a los efectos beneficiosos que se le atribuyen sobre la salud. El pescado y los alimentos derivados son una buena fuente natural de este tipo de PUFAs pero, debido a su naturaleza insaturada, presentan una mayor susceptibilidad a sufrir procesos oxidativos que dan lugar a la formación de los olores y sabores desagradables característicos de la rancidez, y a la pérdida de propiedades nutricionales. Por tanto, la estabilización oxidativa es actualmente uno de los retos a los que se enfrenta la industria pesquera, debido a los beneficios que reporta desde el punto de vista nutricional y comercial.

En los últimos años, los antioxidantes sintéticos, frecuentemente utilizados en la industria para atenuar las consecuencias negativas de la oxidación, están siendo sustituidos por antioxidantes naturales. La principal causa es la sospecha de la toxicidad de los componentes que se forman durante su degradación, además de la escasa aceptación que tienen por parte del consumidor. El uso de antioxidantes naturales se perfila, por tanto, como una alternativa eficaz para incrementar la vida útil de los alimentos susceptibles a sufrir procesos de degradación oxidativa.

El objetivo global de esta tesis, fue el diseño de antioxidantes de origen natural para preservar el músculo de pescado y alimentos enriquecidos en aceite de pescado de la oxidación y el conocimiento de los mecanismos asociados a la efectividad antioxidante de dichos compuestos. Para ello se abordaron los siguientes objetivos parciales

1º: El primer objetivo se centró en el desarrollo de una serie de herramientas analíticas necesarias para el seguimiento de la oxidación lipídica y el estudio de los mecanismos que rigen la actividad de los antioxidantes que posteriormente se ensayaron. Estos estudios se enfocaron en la propuesta de metodologías para la determinación de compuestos antioxidantes presentes en el tejido muscular que pueden tener una elevada repercusión en el desarrollo de la rancidez oxidativa, en concreto, el ácido ascórbico. Asimismo, se desarrolló la metodología para el análisis de compuestos volátiles asociados a la oxidación lipídica tanto en aceite de pescado en forma de emulsión como en músculo de pescado ya que estos sistemas modelo fueron posteriormente utilizados para el estudio de la eficacia y los mecanismos antioxidantes de los aditivos ensayados.

2º: Un segundo objetivo fue el estudio de la efectividad de diversos antioxidantes naturales (ácidos hidroxicinámicos y extractos polifenólicos procedentes de residuos naturales) sobre

Justificación y objetivos

alimentos con un importante contenido en lípidos de origen marino como las emulsiones de aceite de pescado y el músculo de pescado.

3º: El tercer y último objetivo, se enfoca en el estudio de los mecanismos que rigen la actividad de ambos grupos de antioxidantes en función de sus propiedades físico-químicas y de las posibles interacciones con el sistema endógeno antioxidante-prooxidante del músculo de pescado.



INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTOS DERIVADOS DE LOS PRODUCTOS DE LA PESCA. VENTAJAS E INCONVENIENTES

Actualmente no existe una definición mundialmente aceptada del concepto de “alimento funcional” pero, en general, se refiere a cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene sustancias adicionales bioactivas que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. El pescado o los alimentos derivados de productos de la pesca reúnen estas características y su ingesta es altamente beneficiosa tanto desde el punto de vista nutricional, debido a sus proporciones adecuadas de proteínas, vitaminas y minerales (Piggot, 1976), como funcional, ya que numerosos estudios asocian su consumo con efectos beneficiosos para la salud. Además son interesantes por su aporte en ácidos grasos esenciales, que son aquellos ácidos que el organismo humano necesita pero que no es capaz de sintetizar.

La carne de pescado posee una variedad mayor de lípidos que la de cualquier otro animal. Los ácidos grasos de los mamíferos raramente contienen más de dos dobles enlaces por molécula mientras que los depósitos grasos de los peces contienen una gran proporción de ácidos grasos con cinco o seis dobles enlaces denominados ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). La mayor parte pertenecen a la familia ω -3, como los ácidos eicosapentanoico (EPA, 20:5 ω -3), docosahexanoico (DHA, 22:6 ω -3) y docosapentanoico (DPA, 22:5 ω -3), y en menor proporción a la familia ω -6. En la alta proporción de PUFAs radica el interés de estos alimentos desde el punto de vista funcional. Quizás el mayor beneficio en la salud que se ha atribuido a la ingesta de este tipo de ácidos grasos sea la sustancial disminución de los niveles de triglicéridos y del colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Parthasarathy, Quinn & Steinberg, 1988) que se encuentran entre los mayores factores de riesgo de dolencias cardiovasculares y coronarias (Lovegrove, Clohessy, Milon & Williams, 2000). De todas las investigaciones realizadas a este respecto, el pueblo esquimal ha sido, sin duda, el principal referente y protagonista ya que, desde hace tiempo, se sabe que estas poblaciones, que consumían cantidades importantes de pescado o animales marinos, tenían baja incidencia de afecciones cardiovasculares. Una de las pruebas más reveladoras fue el estudio comparativo realizado por Dyerberg, Bang & Hjorne (1975), entre un grupo de esquimales que vivían en Groenlandia, otro que había emigrado a Dinamarca y un tercero de daneses que vivían en Dinamarca. Este trabajo confirmó el hecho, ya conocido, de que los esquimales tienen los valores más bajos de colesterol y triglicéridos sanguíneos y un favorable espectro lipoproteico pero la mayor aportación consistió en demostrar que la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares se debe a

que estos individuos tienen más bajos los niveles de las dos lipoproteínas, LDL y VLDL, que tienen acción negativa en este problema. Además, se comprobó que los esquimales que vivían en Dinamarca tenían igual nivel de estos compuestos que los daneses demostrando que este hecho no se debe a la raza, sino a los hábitos alimentarios. Por último, y a diferencia de lo que ocurría con los daneses, los esquimales de Groenlandia no incrementaban su colesterol con la edad.

Numerosos estudios clínicos sugieren que los ácidos grasos ω -3 y sus metabolitos participan en el tratamiento y prevención de otras muchas enfermedades. Por su efecto antiinflamatorio e inmunológico pueden ejercer de coadyuvantes en el tratamiento de cáncer, asma, psoriasis, enfermedad de Chron, esclerosis múltiple, migraña o artritis, (Cleland, James & Proudman, 2003) y debido a su influencia en la normalización del metabolismo de lípidos se han mostrado eficaces en el tratamiento de enfermedades renales (Cerkauskiene, Kaminskas, Kaltenis & Vitkus, 2003). El consumo de los ácidos grasos DHA y araquidónico (ARA) se ha mostrado eficaz en el tratamiento de determinados desórdenes mentales como el Alzheimer ya que estos lípidos conforman el 40 % de las células del cerebro (Tully et al., 2003). Por último ha sido probada su influencia en el incremento del desarrollo prenatal y postnatal al formar parte del desarrollo de la retina y las conexiones neuronales (Chen & Yeh, 2003). Se ha descrito que los ácidos grasos esenciales proporcionados por los productos derivados de la pesca tienen efectos beneficiosos en el organismo e influyen en la producción hormonal y en la salud inmunitaria y cardiovascular. Deficiencias en varios de estos ácidos grasos se han asociado con desequilibrios hormonales y enfermedades degenerativas.

Muchos científicos y especialistas en nutrición recalcan que la dieta occidental es rica en ácidos grasos ω -6, mientras que el consumo es bajo en ácidos grasos del tipo ω -3. Se ha comprobado que en los dos últimos siglos, el desarrollo tecnológico y el cambio de hábitos ha llevado a una proporción superior de ω -6 de la que sería correcta en una dieta equilibrada (ω -6/ ω -3, entre 4/1 y 2/1) (Simopoulos, 1994). Una dieta que incluya más alimentos ricos en ω -3 como los productos derivados del pescado y la reducción del consumo de carnes rojas, aceites hidrogenados y otras grasas saturadas, contribuye a que el organismo pueda protegerse de muchas de las enfermedades degenerativas de hoy día.

Los lípidos suelen constituir entre un 0,2 y un 25 % del peso en los productos pesqueros (FAO, 1999). En función de la abundancia relativa de éstos, las especies de pescado se clasifican en magras (entre 2 y 5 % de lípidos), semigrasas (entre el 5 y el 15 % de lípidos) o grasas (más del 15 % de lípidos). En los peces magros (bacalao, merluza, crustáceos...) la grasa se almacena en el hígado mientras que en los peces semigrasos (besugo, jurel, palometa...) o grasos (caballa, sardina, atún...),

los depósitos grasos aparecen como gotas extracelulares en el tejido muscular. El músculo de las especies grasas, o semigrasas, se caracteriza por una gran variabilidad estacional del contenido lipídico total, alcanzando en algunos períodos proporciones entre el 4 y el 30 % (Ackman, 1994). Esta variación estacional, dentro de una especie, se debe mayoritariamente a los patrones migratorios, la alimentación y al ciclo reproductivo (Kolakowska, Olley, & Dunstan, 2000). Las especies grasas suelen ser especies pelágicas que se encuentran en aguas poco profundas o superficiales, y se caracterizan por un marcado carácter migratorio (Burt & Hardy, 1992).

Además de las consecuencias positivas desde el punto de vista nutricional y funcional, la elevada cantidad de PUFAs es en parte responsable de que las especies marinas sean conocidas desde antiguo por su fácil y rápida alteración, que provoca cambios negativos desde el punto de vista nutricional y sensorial. Durante el procesamiento y la conservación de los alimentos derivados del pescado la fracción lipídica puede experimentar dos tipos de reacciones con importante repercusión sobre el deterioro de la calidad: la oxidación y la hidrólisis. El alto contenido en PUFAs perjudica dramáticamente la estabilidad del pescado durante el procesado y almacenamiento puesto que estos compuestos son extraordinariamente susceptibles a la oxidación. La descomposición oxidativa origina la aparición de olores y sabores desagradables, asociados a la rancidez (Frankel, 1998) y genera productos que pueden contribuir a los cambios de textura al interactuar con las proteínas musculares. Como consecuencia se produce una considerable reducción de la calidad del alimento limitando su tiempo de conservación (Chan, 1987). Este efecto es especialmente rápido en muchas especies de pescado graso, en las que los PUFAs conviven en el tejido muscular con elevadas concentraciones de hemoglobina (Hb), mioglobina y metales traza, especies prooxidantes potencialmente activadoras del mecanismo de oxidación (Frankel, 1998). Además de las consecuencias desde el punto de vista organoléptico, nutricional y funcional, la oxidación lipídica puede originar sustancias que resultan tóxicas para el organismo, como radicales libres, peróxidos, aldehídos, o epóxidos (Kolakowska, Olley, & Dunstan, 2000).

La oxidación lipídica es un fenómeno químico que no se puede evitar o paralizar completamente. Tras su inicio, se transforma en una reacción en cadena de difícil control, aumentando su velocidad muy rápidamente en un corto espacio de tiempo. Este fenómeno es muy importante desde el punto de vista de la comercialización de los productos derivados de la pesca ya que las diversas etapas de captura, producción, empaquetado, almacenaje, comercialización, distribución y utilización por el consumidor final, pueden suponer desde pocas semanas a algunos meses. Este proceso no se puede revertir pero se puede retardar utilizando diversas estrategias de tal forma que se obtenga un aumento significativo en la estabilidad y vida útil del producto final. La

congelación es el método por excelencia para preservar la calidad del pescado durante un mayor período de tiempo pero existen otras metodologías como el envasado al vacío o en atmósferas modificadas, la aplicación de altas presiones o la eliminación de sustancias prooxidantes, como la Hb, mediante la aplicación del sangrado (Richards & Hultin, 2002). Las distintas especies de pescado poseen un sistema antioxidante endógeno que termina consumiéndose debido a las alteraciones que se producen tras la muerte del pescado o en las diferentes etapas del procesado. Este consumo descompensa el balance entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes presentes en el músculo desembocando en el comienzo de la oxidación lipídica. Esa pérdida puede ser compensada mediante la utilización de aditivos antioxidantes. Aunque los antioxidantes sintéticos resultan eficientes y relativamente baratos, su uso tiende a restringirse debido a la pobre aceptación que presentan en el consumidor y a numerosos estudios que ponen en juicio su seguridad toxicológica (Frankel, 1998). Por ello, en los últimos años, han aumentado casi exponencialmente las investigaciones destinadas al estudio de las propiedades antioxidantes de compuestos de origen natural, con la finalidad de proponer antioxidantes naturales alternativos a los sintéticos. Los aditivos antioxidantes podrían, además, incrementar el carácter funcional de los alimentos sobre los que se apliquen puesto que se ha postulado que este tipo de compuestos pueden ejercer una acción beneficiosa frente a patologías derivadas del estrés oxidativo (Espín, García-Conesa & Tomás-Barberán, 2007).

2. LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA

Los lípidos presentes en los productos derivados de la pesca pueden ser divididos en dos grandes grupos: los saponificables y los no saponificables (Fig. 1).

Los lípidos saponificables se caracterizan porque se hidrolizan en soluciones alcalinas produciendo ésteres de ácidos grasos. Los fosfolípidos (Fig. 2) son lípidos iónicos saponificables, compuestos por un glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. Constituyen la estructura integral de la unidad de membranas en la célula, por lo que a menudo se le denomina lípidos estructurales (Igene, King, Pearson & Gray, 1979). Los triglicéridos están formados por una molécula de glicerol, con tres ácidos grasos esterificados. Son lípidos empleados para el almacenamiento de energía en depósitos de grasa, generalmente dentro de células especiales rodeadas por una membrana fosfolipídica y una red de colágeno relativamente débil (FAO, 2002).

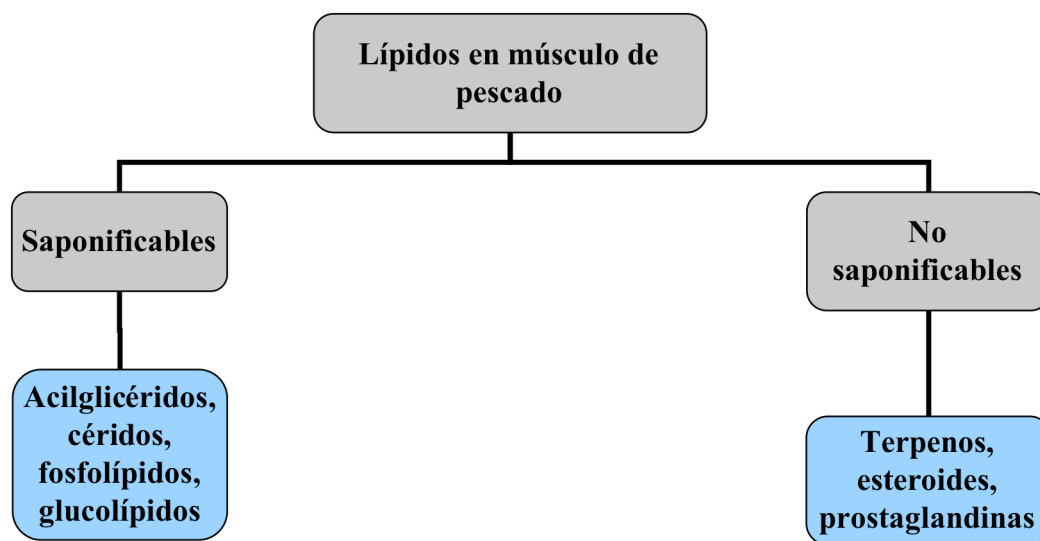


Figura 1: Lípidos presentes en músculo de pescado.

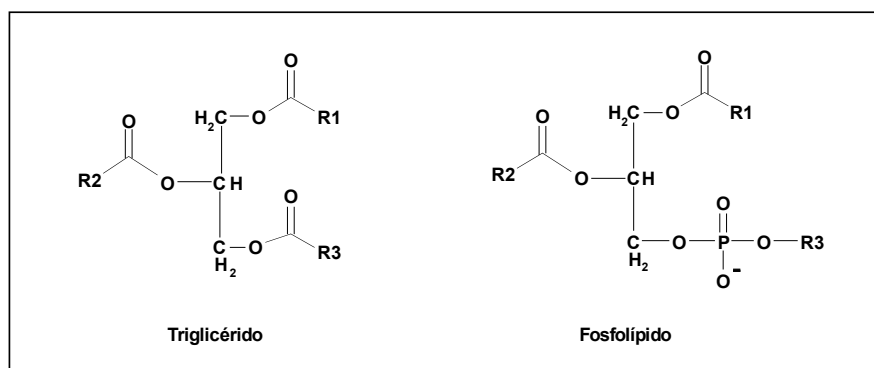


Figura 2: Estructura básica de los triglicéridos y fosfolípidos

Como se ha mencionado anteriormente, el alto contenido de PUFAs en los productos derivados de la pesca, especialmente de los ω -3 como el EPA y DHA, influye en la estabilidad y calidad del alimento y lo hace muy susceptible a la oxidación lipídica. La menor energía de enlace de los hidrógenos bis-alílicos y alílicos, frente a los hidrógenos de grupos metileno (75 y 88, frente a 100 Kcal/mol, respectivamente), junto con la estabilización por resonancia del radical formado, contribuyen a la mayor inestabilidad oxidativa de los PUFA (Erickson, 2002). El resultado de este

proceso es la aparición de la rancidez y de cambios en las propiedades organolépticas, la textura y el valor nutricional del producto. En el músculo de pescado fresco, el balance oxidativo entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes se mantiene durante un corto período de tiempo a partir de su muerte. Si el tiempo de almacenamiento o procesado es demasiado prolongado se produce el desarrollo de la oxidación que desemboca en los efectos negativos anteriormente mencionados. Por lo tanto es muy importante el conocimiento del mecanismo químico mediante el cual se lleva a cabo este proceso con el objetivo de poder desarrollar estrategias de prevención y minimizar la pérdida de calidad de estos alimentos tanto desde el punto de vista sensorial como nutricional y funcional.

2.1. Cambios post-mortem producidos en el músculo de pescado

Las modificaciones físico-químicas que ocurren en el músculo del pescado desde el momento de su muerte varían considerablemente en función de factores intrínsecos (especial susceptibilidad a la degradación de sus componentes o al ataque microbiano, gran cantidad de enzimas autolíticas,...) y extrínsecos (el hábitat del pescado, el método de captura, el tiempo empleado hasta ser sometido a procesos de conservación o la manipulación a la que se ve sometido a bordo). En este capítulo solo nos referiremos a los cambios que afectan a la posterior degradación lipídica. Éstos son resumidos en la Fig. 3.

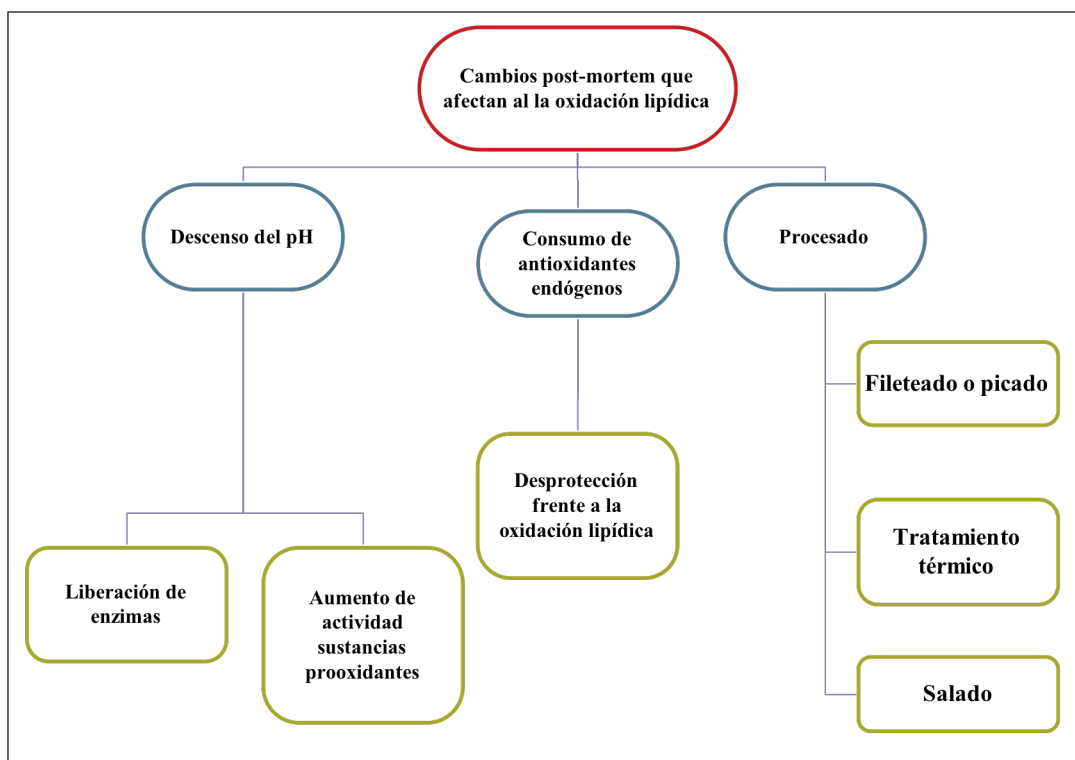
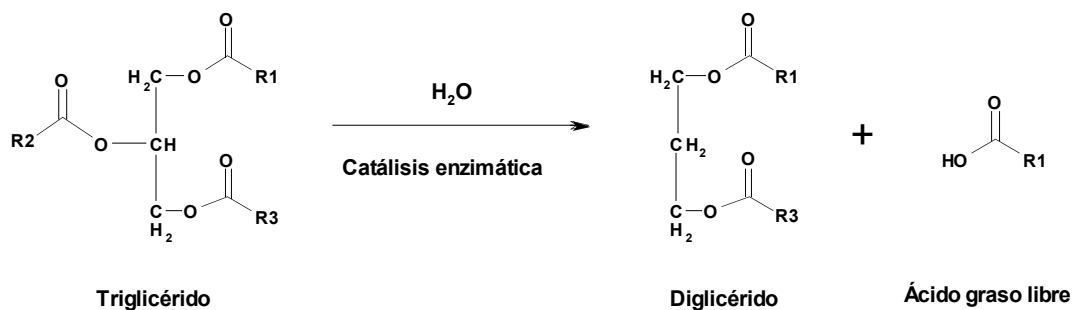


Figura 3: Cambios post-mortem en el músculo de pescado que afectan a la oxidación lipídica

En el momento de la muerte, el suministro de oxígeno al tejido muscular del pescado se interrumpe y se restringe la producción de energía al mecanismo de glucólisis anaerobia. La concentración de ácido láctico que genera este proceso origina un importante descenso del pH provocando la autólisis de las membranas celulares del animal, liberando las enzimas contenidas en los lisosomas. Entre éstas se encuentran las lipasas, encargadas de catalizar la hidrólisis de triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos libres.



El descenso del pH del músculo tiene consecuencias directas sobre el mecanismo radicalario de la oxidación de los ácidos grasos ya que numerosos estudios han demostrado que aumenta dramáticamente la actividad prooxidante de las hemoproteínas de pescado, catalizadores de la reacción de deterioro oxidativo (Richards & Hultin, 2000).

Los procesos a los que se ve sometido el músculo de pescado tras su captura también resultan importantes en el mecanismo de la oxidación lipídica:

- El fileteo o el picado, provocan la rotura del compartimento celular, poniendo en contacto el oxígeno y otros promotores de la oxidación, con el sustrato lipídico.
- El tratamiento térmico causa la desnaturalización y la inactivación de las enzimas implicadas en los mecanismos de oxidación. Además se produce la liberación del hierro unido a las proteínas.
- El salado incrementa la actividad catalítica del hierro y reduce la actividad de las enzimas antioxidantes.

2.2. Mecanismos de oxidación lipídica

La oxidación lipídica es la reacción por la cual el oxígeno molecular reacciona con los ácidos grasos para formar los peróxidos lipídicos. Este mecanismo se lleva a cabo mediante la formación de radicales libres de los ácidos grasos o fosfolípidos. El mecanismo completo es de tipo radicalario y consta de tres etapas bien diferenciadas: iniciación, propagación y terminación.

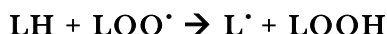
2.2.1. Etapa de iniciación

Consiste en la formación de radicales libres a partir de los ácidos grasos no saturados por rotura homolítica del enlace C-H o abstracción de un átomo de hidrógeno. En los PUFAs, esta reacción se ve altamente favorecida debido a la alta reactividad de los grupos metileno adyacentes a los dobles enlaces. Los radicales libres lipídicos tienden a estabilizarse mediante un reordenamiento interno dando lugar a los dienos conjugados.



2.2.2. Etapa de propagación

Los radicales libres formados en la etapa de iniciación (L^{\bullet}) pueden reaccionar con el oxígeno para formar radicales peróxido (LOO^{\bullet}) los cuales forman inmediatamente hidroperóxidos ($LOOH$) abstrayendo otro hidrógeno a un ácido graso y propagando la reacción en cadena.



Los hidroperóxidos generados también pueden fragmentarse por acción térmica, o descomponerse por la catálisis de metales de transición, lo que genera nuevos radicales que autocatalizan el proceso de oxidación (Frankel, 1998).



2.2.3. Etapa de terminación

La cadena de reacciones generada se concluye en la etapa de terminación cuando dos radicales se combinan para dar productos que no pueden formar parte en las reacciones de la etapa de propagación. Pueden ocurrir de forma simultánea a las reacciones de propagación y motivan la formación de los diversos compuestos volátiles responsables de la rancidez.



Todas estas reacciones se producen de forma simultánea en el sistema de músculo de pescado. La Fig. 4 representa este proceso de deterioro oxidativo, donde AH_2 representa un compuesto antioxidante. El diagrama muestra la naturaleza cíclica del mismo.

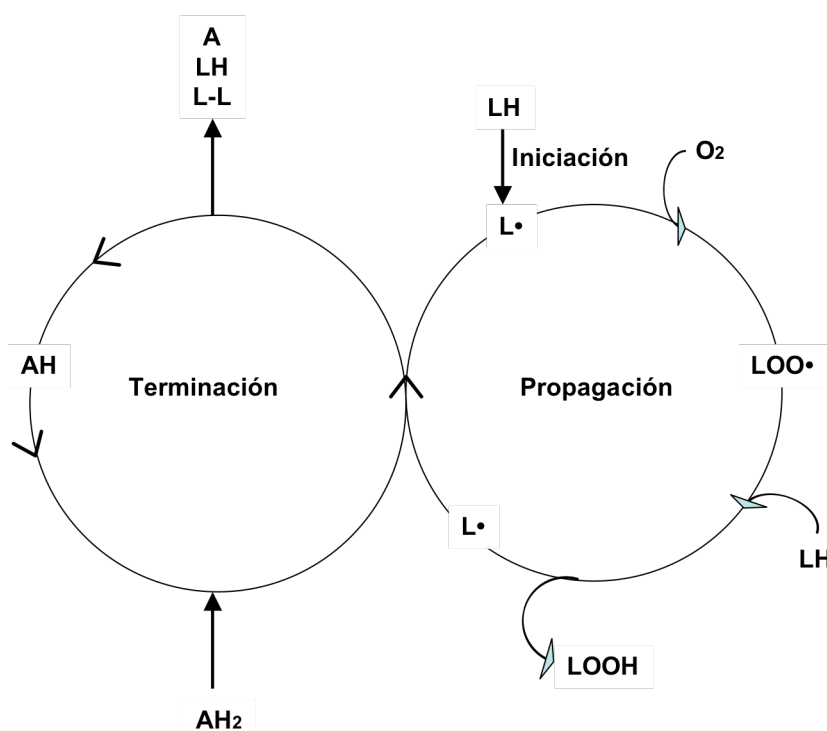


Figura 4: Proceso cíclico del deterioro oxidativo en el músculo de pescado.

2.3. Mecanismos de aparición de radicales libres lipídicos.

La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno en estado triplete está prohibida por el principio de conservación de spin ya que la multiplicidad de los lípidos en su estado de menor energía es singlete. Para que tenga lugar la oxidación lipídica es necesaria la intervención de iniciadores que catalicen el proceso, entre los que se encuentra la energía proporcionada por la luz o la temperatura, y la presencia de sustancias prooxidantes como metales, metaloproteínas, enzimas y algunos microorganismos. Según cuales sean esos iniciadores, los mecanismos por los que da comienzo el proceso oxidativo serán diferentes.

Reacciones de autooxidación: Las reacciones de autooxidación se inician mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso (LH), rindiendo un radical alquilo (L•) (Halliwell & Gutteridge, 1985). El radical alquilo reacciona con el oxígeno molecular en su estado fundamental, oxígeno triplete (³O₂), para formar un radical peroxilo (LOO•). Dicho radical puede sustraer un átomo de hidrógeno de un nuevo ácido graso para formar un peróxido lipídico (LOOH) y un nuevo radical alquilo (L•). Éste es el proceso más común por el cual los ácidos grasos son oxidados (Erickson, 2002). En este caso, la barrera cinética es superada

mediante la producción de radicales libres formados tras la disociación térmica de hidroperóxidos presentes como impurezas ($\text{LOOH} \rightarrow \text{LO}^\bullet + \text{}^\bullet\text{OH}$) o la intervención de distintos iniciadores (Frankel, 1998). Se ha comprobado que diversos hidroperóxidos son formados cuando la luz o ciertas moléculas fotosensibles están presentes. Ésto es debido a que la luz puede producir oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) en presencia de sustancias fotosensibles (Allen & Hamilton, 1994). El $^1\text{O}_2$ reacciona 1500 veces más rápido con los lípidos que el oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), adicionándose directamente a los dobles enlaces y dando lugar a la formación de hidroperóxidos alílicos.

Reacciones enzimáticas: Los principales grupos de enzimas implicados en este proceso son las lipoxigenasas (LOX), las ciclooxigenasas (COX), las enzimas microsomiales, las peroxidasas y las dioxigenasas. Las LOX y la COX, son dioxigenasas que producen hidroperóxidos incorporando de forma estereoselectiva, una molécula de oxígeno en una posición bisalílica del PUFA (Frankel, 1998). In vivo, estas enzimas son las encargadas de la síntesis de eicosanoides que los organismos utilizan para multitud de funciones, entre las que se encuentran la participación en procesos de inflamación o en la respuesta inmune. Tras la muerte del pescado, su actividad se vuelve incontrolada, participando de forma activa en el proceso de oxidación lipídica del músculo. Kanner & Kinsella (1983) demostraron que la oxidación lipídica también puede ser iniciada por la enzima peroxidasa presente en el propio tejido del pescado. Las enzimas responsables de la oxidación lipídica se encuentran mayoritariamente en las branquias o la piel del pescado. Probablemente, su actividad tiene importancia en la oxidación de los lípidos sólo en el pescado fresco ya que la cocción o las operaciones de congelado/descongelado destruyen efectivamente su actividad (FAO, 1999).

2.4. Formación de productos secundarios de la oxidación lipídica

Los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación de la oxidación lipídica son compuestos sin sabor ni olor y frecuentemente se hace referencia a ellos como los *productos primarios* de la oxidación. Los hidroperóxidos se caracterizan por su inestabilidad descomponiéndose de forma rápida para dar una serie de compuestos volátiles como aldehídos, cetonas o alcoholes, que tienen un fuerte impacto desde el punto de vista sensorial a extremadamente bajas concentraciones, a menudo inferiores a 1 ppm (Frankel, 1998). Los productos secundarios de la oxidación, sobre todo los formados mediante catálisis enzimática, son los responsables de los olores y sabores característicos del pescado fresco. Sin embargo, el almacenamiento prolongado de productos derivados de la pesca provoca un incremento de la formación de este tipo de compuestos, mayoritariamente mediante mecanismos de autooxidación,

derivando en la aparición de los olores y sabores desagradables asociados a la rancidez (Karahadian & Lindsay, 1989). La presencia de volátiles procedentes de la oxidación lipídica también afecta negativamente al valor nutricional, toxicidad y a aspectos tecnológicos debido su interacción con las proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, la sensación organoléptica de la rancidez puede ser causada por la oxidación de los lípidos del músculo tras la reacción directa con el oxígeno atmosférico (autooxidación) o mediante catálisis enzimática (Allen & Hamilton, 1994). Los hidroperóxidos formados a partir de estos mecanismos son muy inestables y se rompen dando lugar a moléculas de bajo peso molecular, volátiles y, en muchos casos, con un bajo umbral de detección sensorial incluyendo aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, hidrocarburos, lactonas, ésteres o furanos. La composición lipídica del músculo y el mecanismo de formación de los hidroperóxidos determinará el tipo, la cantidad, y la velocidad de formación de estos compuestos. Ambos mecanismos, enzimáticos y no enzimáticos, son difíciles de distinguir ya que ocurren simultáneamente. Las condiciones en las que se lleva a cabo la oxidación (temperatura, pH,...) son clave para que se produzca la formación de unos u otros compuestos. Generalmente, el almacenamiento a bajas temperaturas favorece la oxidación enzimática mientras que las altas temperaturas favorecen la autooxidación (Frankel, 1998). El mecanismo de formación de productos secundarios a partir del EPA, mediante catálisis enzimática, se lleva a cabo en un rango de pH que va de 6 a 9 unidades siendo pH 7 el valor óptimo al cual actúa la enzima LOXs (Kawai, 1996). Del mismo modo, el proceso de autooxidación se lleva a cabo a pH 4 con mayor velocidad.

2.4.1. Volátiles formados mediante el mecanismo de autooxidación.

Los hidroperóxidos formados durante el proceso de oxidación lipídica se pueden descomponer térmicamente o en presencia de catalizadores metálicos. El mecanismo más probable para la descomposición de los hidroperóxidos es la rotura homolítica del enlace entre los oxígenos del grupo RO-OH (con una energía de activación más baja) formándose un radical alcóxil (Fig. 5). La rotura de este radical por uno de los dos enlaces C-C adyacentes al oxígeno produce un radical alquilo y un radical vinilo. El radical alquilo puede reaccionar con un radical hidrógeno, un radical hidroxilo o con oxígeno molecular dando lugar a la formación de hidrocarburos, alcoholes u otros hidroperóxidos respectivamente. El radical vinilo es también muy reactivo y puede reaccionar con un radical hidroxilo, con un radical de hidrógeno o con oxígeno molecular dando lugar a la formación de aldehídos y olefinas (Fig 5). Además de este mecanismo, los radicales alcóxilo pueden sufrir procesos de epoxidación o reaccionar entre ellos o con otros radicales alquilo para dar lugar a la formación de otros productos estables.

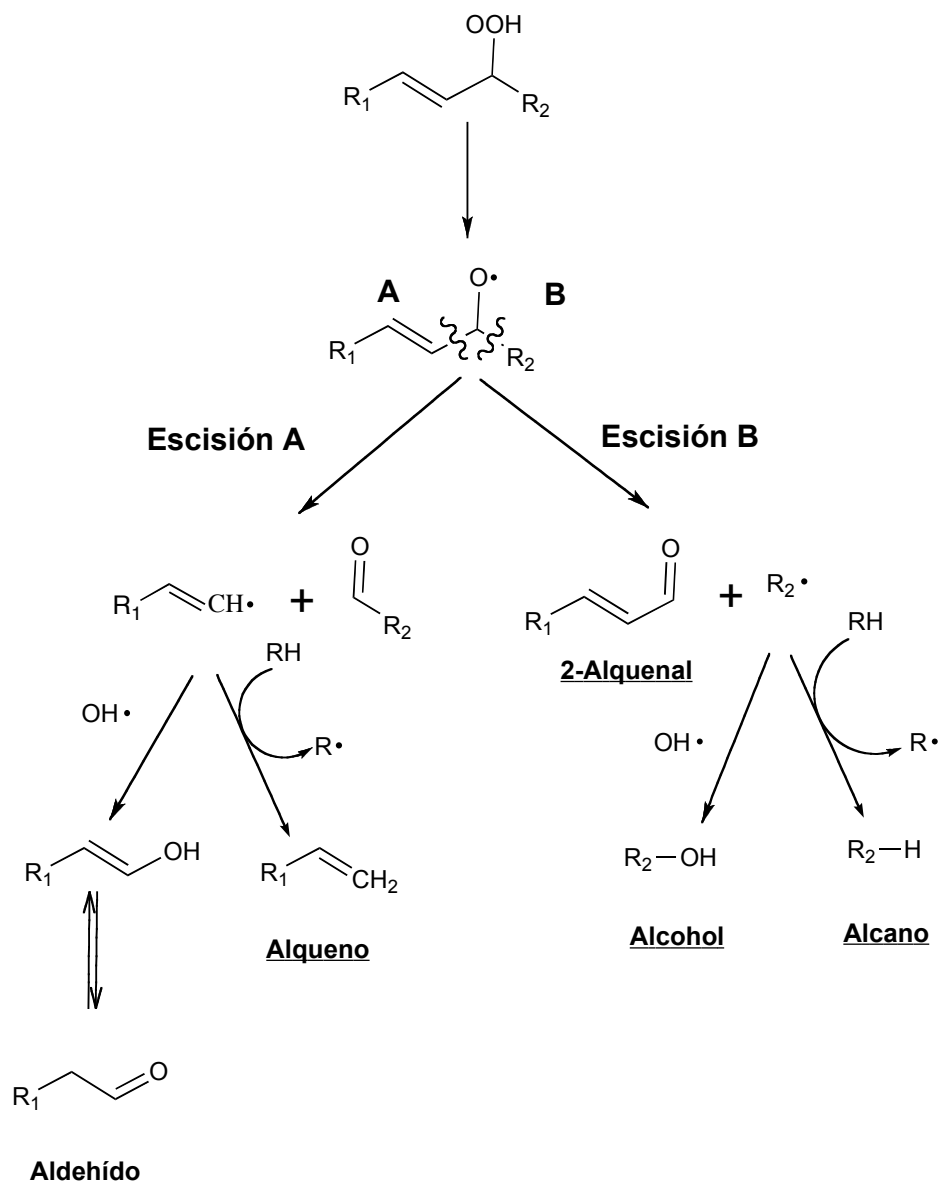


Figura 5: Mecanismos de autooxidación

La formación de los distintos compuestos volátiles dependerá en cada caso del ácido graso del cual se deriva el hidropéroxido y del carbono sobre el que se forma dicho hidropéroxido. La Tabla 1 muestra los compuestos más representativos formados mediante los distintos mecanismos de autooxidación.

El mecanismo de escisión de los hidropéroxidos lipídicos (Fig. 5) explica la formación de muchos de los volátiles en los productos de la pesca como los carbonilos, alcoholes, ésteres e

hidrocarburos. La formación de otras familias de volátiles, como los furanos, dienales, epoxialdehídos, cetonas, lactonas, alquinos y compuestos aromáticos, se lleva a cabo mediante otros mecanismos propuestos por diversos autores ya que no puede ser explicada mediante la rotura o β -escisión de monohidroperóxidos. Entre los compuestos más importantes usados como marcadores de la oxidación lipídica, Josephson (1991) propone la formación de (*E,Z*)-2,4-heptadienal y la 3,5-octadien-2-ona a partir de la autooxidación de EPA (Fig. 6), mientras que Medina, Satué-Gracia & Frankel (1999), Sakakibara, Ide, Yanai, Yajima & Hayashi (1990) y Frankel (1983) proponen los mecanismos de formación de 2-etilfurano y 2-pentilfurano (Fig 7). Estos volátiles han sido utilizados en diversos trabajos como marcadores de la oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado y músculo de pescado (Medina, Satué-Gracia & Frankel, 1999, Sakakibara, Ide, Yanai, Yajima & Hayashi, 1990, Venkateshwarlu, Let, Meyer & Jacobsen, 2004). Los precursores del 2-etilfurano serían el 12-hidroperóxido del ácido linolénico (18:3 n-3), el 14-hidroperóxido de EPA (20:5 n-3) o el 16-hidroperóxido de DHA (22:6 n-3). El mecanismo de formación de 2-pentilfurano sería similar pero en este caso los precursores serían ácidos grasos de tipo n-6.

Compuesto	Origen (PUFA)	Umbral de detección sensorial (ppb)	Descripción del aroma	Compuesto	Origen (PUFA)	Umbral de detección sensorial (ppb)	Descripción del aroma
Alcanales				2-Alquenos			
Propanal	n-3	9,5	Disolvente, picante, plástico	2-Butenal	-	-	Leña, sulfurado
Butanal	Ácidos oleico y linoleico	9,0-37,0	Picante, Verde	(E)-2-Pental	n-3 PUFA	1500	Afrutado, fresa
Pental	n-6 PUFA	12,0-42,0	Químico, vino, dulce, afrutado	(E)-2-Heptenal	n-3 y n-6 PUFA	13	Jabón, Almendra
Hexanal	n-3, n-6 y n-9 PUFA	4,5	Grasiento, verde, picante	(E)-2-Octenal	n-6 PUFA	1,0	Graso, nuez, verde, champiñón
Heptanal	Ácidos oleico y linoleico	3,0	Hierbas, pescado, grasiento, picante	(E)-2-Nonenal	n-6 PUFA	0,1	Verde, graso, pepino, jabón, dulce
Octanal	Ácidos oleico y linoleico	0,7	Grasiento, afrutado, cítrico	2,4-Alcadienales			
Nonanal	Ácidos oleico y linoleico	1,0	Verde, cítrico, sebo, grasiento, jabonoso	(E,E)-2,4-Hexadienal		10,0-60,0	Verde, rancio
Decanal	n-9 PUFA	2,0	Verde, marino, pepino, floral	(E,E)-2,4-Heptadienal	n-3 PUFA	10,0	Verde, marino, grasos, nuez
Undecanal	Ácido oleico	-	Fruta, verde, ceroso, aceite	(E,Z)-2,4-Heptadienal	n-3 PUFA	10,0	Fritos
Furanos				(E,E)-2,4-Decadienal	n-6 PUFA	0,07	Verde, graso
2-Etilfurano	n-3 PUFA		Caucho, acre, ácido, dulce				
2-Pentilfurano	n-6 PUFA		Verde, mantequilla, frijol				

Tabla 1: Volátiles formados a partir de mecanismos de autooxidación. Los valores de los umbrales de detección sensorial son calculados en disolución acuosa.

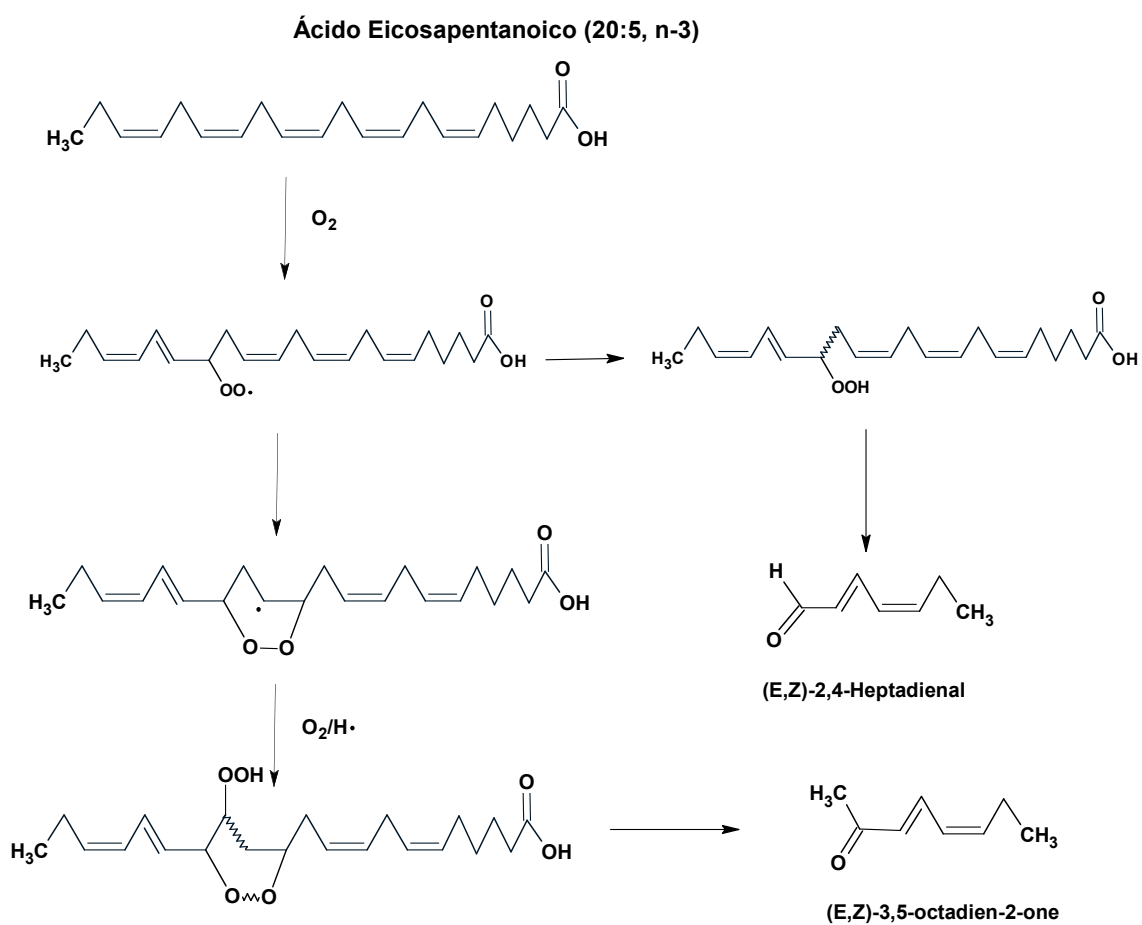


Figura 6: Mecanismo de formación de (E,Z)-2,4-heptadienal y (E,Z)-3,5-octadien-2-ona.

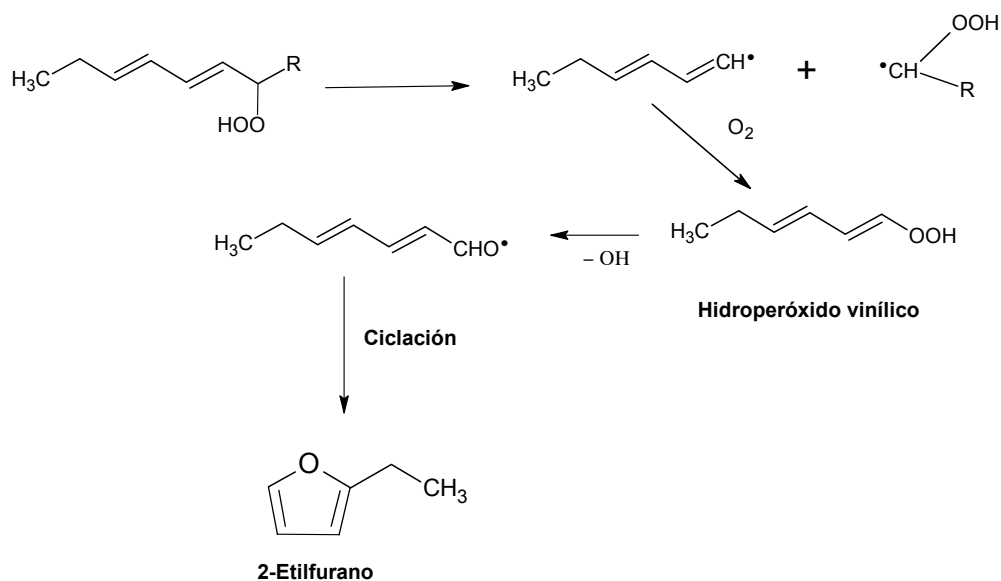


Figura 7: Mecanismo de formación de 2-etilfurano

Los aldehídos alifáticos son los volátiles más abundantes e importantes formados mediante autooxidación de PUFAs. Los n-alkanales son producidos fundamentalmente de los PUFAs n-3 y n-6 y de los ácidos grasos monoinsaturados n-9 (Tabla 1). Jónsdóttir, Ólafsdóttir, Chanie, & Haugen (2008) identificaron al hexanal, nonanal y decanal entre los mayores contribuyentes al olor del salmón ahumado debido a las altas concentraciones encontradas. Los 2-alcenales se han encontrado en multitud de productos derivados de la pesca. Se forman a partir de los PUFAs n-3, especialmente los aldehídos de cadena corta (del 2-butenal al 2-heptenal). El E-2-pentenal ha sido identificado en salmón fresco (Wierda, Fletcher, Xu & Dufour, 2006) mientras que Grün, Barbeau & Crowther (1996) identificaron, entre otros, el E-2-hexenal, el E-2-octenal y el 2-nonenal como marcadores de la oxidación lipídica en aceite de menhaden. Entre los 2,4-alcadienales, el 2,4-hexadienal se ha encontrado en distintas especies como la anchoa (Cha & Cadwallader, 1995), dorada de acuicultura (Grigorakis, Taylor & Alexis, 2003) o el atún (Roh, Park, Park & Chun, 2006). Los dos isómeros de 2,4-heptadienal son los alcadienales más abundantes y más utilizados como marcadores de oxidación lipídica en productos derivados de la pesca. El mecanismo de la Fig. 6 explica su formación a partir de EPA pero de la misma forma se puede generar a partir del 12-hidroperóxido procedente del ácido linolénico (Hsieh & Kinsella, 1989). El 2,4-decadienal ha sido caracterizado como un importante volátil desde el punto de vista organoléptico en diversas especies de pescado (Cha & Cadwallader, 1998, Guillén & Errecalde, 2002, Prost, Serot & Demaimay, 1998). Generalmente procede de los n-6 PUFAs, como los ácidos linoleico y araquidónico.

Se han establecido diferencias entre los volátiles formados mediante mecanismos de fotooxidación y los obtenidos mediante el mecanismo de autooxidación catalizada por metales. Así, por ejemplo, los mecanismos de oxidación catalizados por la luz dan lugar a una mayor proporción de 2-alquenes mientras que los 2,4-alcadienes proceden mayoritariamente de la descomposición de hidroperóxidos formados mediante catálisis metálica (Varlet, Prost & Serot, 2007).

2.4.2. Volátiles formados mediante catálisis enzimática

Al contrario que en el mecanismo de autooxidación, las enzimas que catalizan la oxidación lipídica son altamente específicas desde el punto de vista del sustrato sobre el que actúan y de la estereoisomería de los productos. Las LOXs, detectadas en numerosas especies de pescado, son las responsables de la adición estereoisomérica del oxígeno a los ácidos grasos que contienen el grupo 1,4-cis-pentadieno y conforman el conjunto de enzimas con mayor actividad en músculo de pescado (German, Chen & Kinsella, 1985, German & Creveling, 1990, Josephson, Lindsay & Stuibler, 1984, Liu & Pan, 2004, Mohri, Cho, Endo & Fujimoto, 1992, Saeed, 2001). Mientras que las LOXs de las plantas actúan sobre los PUFAs Linoleico (C18:2 n-6) y Linolénico (C18:3 n-3), las del pescado o de los productos derivados de la pesca actúan sobre PUFAs más insaturados como el ARA (C20:4 n-6), EPA (C20:5 n-3) y DHA (C22:6 n-3) que son más abundantes en el músculo. La inserción del oxígeno se produce de manera dirigida, tanto desde el punto de vista posicional (carbono del ácido graso sobre el que actúan) como geométrico, dando lugar a hidroperóxidos y volátiles específicos (Grun, Barbeau & Crowther, 1996). Su actividad se lleva a cabo sobre triglicéridos o ácidos grasos libres y no se ha observado sobre fosfolípidos. Tan sólo se han encontrado tres tipos de LOX en el pescado, según la posición del ácido graso sobre la que insertan el oxígeno molecular: las 12-, 15- o 13-LOX, que dan lugar a los denominados 12-hidroperóxidos, 15-hidroperóxidos o 13-hidroperóxidos. La 12-LOX es la más común (German & Hu, 1990, Hsieh, German & Kinsella, 1988, Hsieh, German & Kinsella, 1988, Saeed, 2001) pero se ha detectado la actividad de la 15-LOX en las agallas de distintas especies de trucha y lubina (German & Creveling, 1990) o la 13-LOX en sardina (Mohri, Cho, Endo & Fujimoto, 1992). Las 12- y 15-LOX son las más comunes pero no están igualmente distribuidas en todas las especies de pescado. Las especies de agua dulce, como la trucha, muestran una mayor actividad de 12-LOX mientras que la 15-LOX es casi indetectable (German, Zhang & Berger, 1992). La mayor actividad en la carpa procede de la 12-LOX pero se ha demostrado que la 15-LOX también actúa de manera importante en la oxidación lipídica del músculo. Sin embargo, esta última es la enzima con mayor actividad en esturión (German, Zhang & Berger, 1992).

La generación enzimática de volátiles a partir de los ácidos grasos del músculo de pescado es la responsable de los aromas relacionados con la frescura. Muchas veces la diferencia entre la detección de olores agradables asociados con la frescura y los desagradables asociados al deterioro lipídico depende de la cantidad generada de dichos compuestos. La Tabla 2 muestra los compuestos volátiles más representativos derivados de la oxidación enzimática.

Se han propuesto distintos mecanismos de formación de volátiles vía LOX. Como ejemplo, se muestra el mecanismo a partir del EPA (Fig. 8) donde se ilustra la formación de compuestos monoinsaturados de 5 y 6 carbonos (1-penten-3-ol, Z-3-hexenal, E-2-hexenal o 3-hexen-1-ol) e insaturados de 8 y 9 carbonos (3,6-nonadienal, 2,6-nonadienal, 3,6-nonadien-1-ol, 1,5-octadien-3-ol y 1,5-octadien-3-ona). El DHA podría ser igualmente precursor de estos volátiles mientras que el ácido araquidónico u otros PUFAs de tipo n-6 podrían servir como sustratos de los volátiles saturados de 6 carbonos o los monoinsaturados de 8 y 9 carbonos (Josephson & Lindsay, 1986).

Compuesto	Umbral de detección sensorial (ppb)	Descripción del aroma
Carbonilos		
Hexanal	4,5	Verde, Aldehído
E-2-Hexenal	-	Afrutado, fresa, cereza, verde almendra
Z-4-Heptenal	0,04	Patata cocida, cremoso como a galleta
1-Octen-3-ona	0,09	Seta, metálico, sucio, polvo
1,5-Octadien-3-ona	0,001	Geranio
E-2-Octenal	-	Verde
E-2-Nonenal	-	Graso, verde, pepino, jabón, floral
(E,Z)-2,6-Nonadienal	2,0	Pepino, Melón
Z-6-Nonenal	-	Cáscara de melón
(Z,Z)-3,6-Nonadienal	-	Melón
Alcoholes		
1-Penten-3-ol	400	Mantequilla, lácteo
Z-3-Hexen-1-ol	70	Verde, hoja
1-Octen-3-ol	10	Seta, melón
1,5-Octadien-3-ol	10	Seta, alga marina
2-Octen-1-ol	40	Grasa, rancio
2,5-Octadien-1-ol	-	Seta, alga marina
Z-6-Nonen-1-ol	-	Verde, melón
(E,Z)-3,6-Nonadien-1-ol	10	Pepino, melón

Tabla 2: Volátiles formados mediante catálisis enzimática. Los valores de los umbrales de detección sensorial son calculados en disolución acuosa.

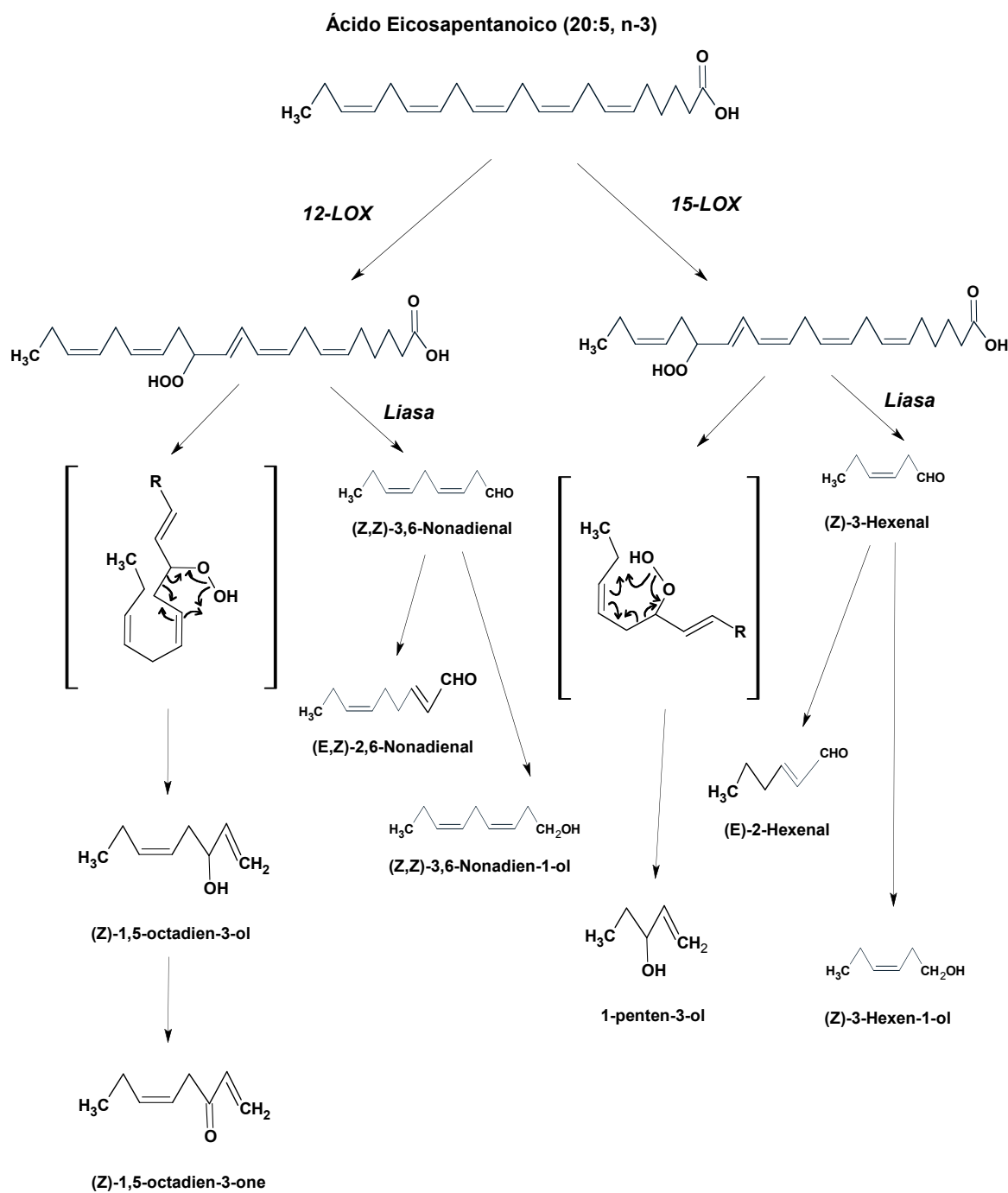


Figura 8: Mecanismos de formación de distintos volátiles mediante catálisis enzimática

Diversas publicaciones muestran la identificación de algunos de estos volátiles en productos derivados de la pesca entre los que destacan el 1-penten-3-ol, identificado en salmón ahumado (Jónsdóttir, Ólafsdóttir, Chanie & Haugen, 2008), arenque (Joaquin, Tolasa, Oliveira, Lee

& Lee, 2008) o sardina (Ganeko et al., 2008) o el 1-octen-3-ol en salmón (Wierda, Fletcher, Xu & Dufour, 2006) o bacalao (Jonsdottir, Olafsdottir, Martinsdottir & Stefansson, 2004). El Z-4-heptenal es uno de los compuestos más importantes derivados de la oxidación lipídica por su contribución al olor característico del pescado rancio a muy bajas concentraciones debido a su bajo umbral de detección sensorial (Tabla 2). En la Fig. 9 se muestra el mecanismo de formación a partir del 2,6-nonadienal (Josephson D. B. & Lindsay R. C., 1987). Presenta un aroma descrito como acartonado a bajas concentraciones (Karahadian & Lindsay, 1989) mientras que a mayores concentraciones es descrito como a pintura o aceite de linaza (Lindsay, 1990). Su producción se acelera con el incremento de temperatura y a pHs altos, y se da habitualmente en pescado cocinado y almacenado. Ha sido utilizado en varios trabajos como marcador de la oxidación lipídica y como importante contribuyente a la rancidez del pescado (Chung, Yeung, Kim & Chen, 2007, Triqui & Bouchriti, 2003, Triqui, 2006).

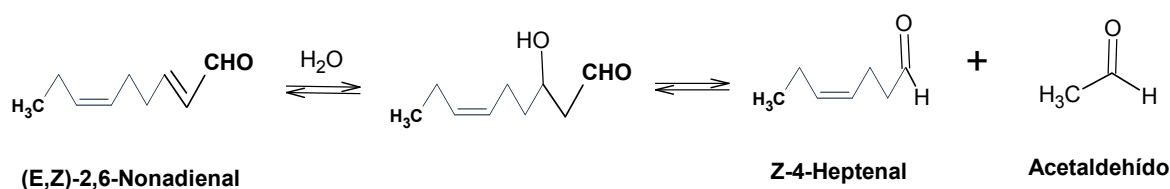
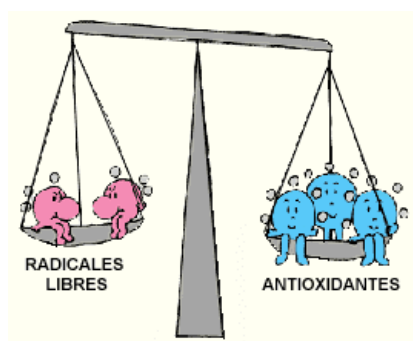


Figura 9: Mecanismo de formación del Z-4-heptenal

3. BALANCE REDOX EN EL MÚSCULO DE PESCADO POST MORTEM

Las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), se forman en los seres vivos, incluidos los peces, como subproductos de distintos procesos metabólicos en las células. Con el



objetivo de evitar los perjuicios que producen estas especies, responsables de la oxidación lipídica, los organismos vivos han desarrollado sistemas de defensa para mantener el “balance oxidativo” y evitar los procesos que finalmente podrían conducir a daños en los distintos tejidos. *In vivo*, el músculo de pescado contiene diferentes sistemas antioxidantes que estabilizan su alto contenido en PUFAs y que en condiciones post-mortem, debido a que no pueden ser regeneradas, son

consumidos en el intento de frenar el desarrollo oxidativo. Como consecuencia, tras las distintas etapas de tratamiento o almacenamiento del pescado, se produce un desequilibrio en el balance oxidativo desembocando en el desarrollo de la oxidación lipídica y sus consecuencias negativas. Los procesos de oxidación lipídica están favorecidos termodinámicamente pero la reacción directa entre el oxígeno molecular y los lípidos del pescado está cinéticamente impedida. Esta reacción puede ser acelerada por la luz o por distintas sustancias catalizadoras denominadas componentes prooxidantes, de tipo enzimático y no enzimático. Por tanto, el desarrollo de la oxidación en el músculo de pescado va a depender, además de la concentración y tipo de lípidos y la concentración de oxígeno, substratos del proceso, del balance de sustancias prooxidantes y antioxidantes presentes en el mismo.

3.1. Componentes catalizadores de la oxidación lipídica en el músculo de pescado

Entre los factores más importantes en el desarrollo de la oxidación lipídica destacan la luz, la temperatura, y la presencia de sustancias prooxidantes como los metales, las metaloproteínas, enzimas y algunos microorganismos (Frankel, 1998). En general, las sustancias prooxidantes del músculo de pescado se suelen dividir en dos grupos: los componentes enzimáticos y los no enzimáticos (Fig. 10).

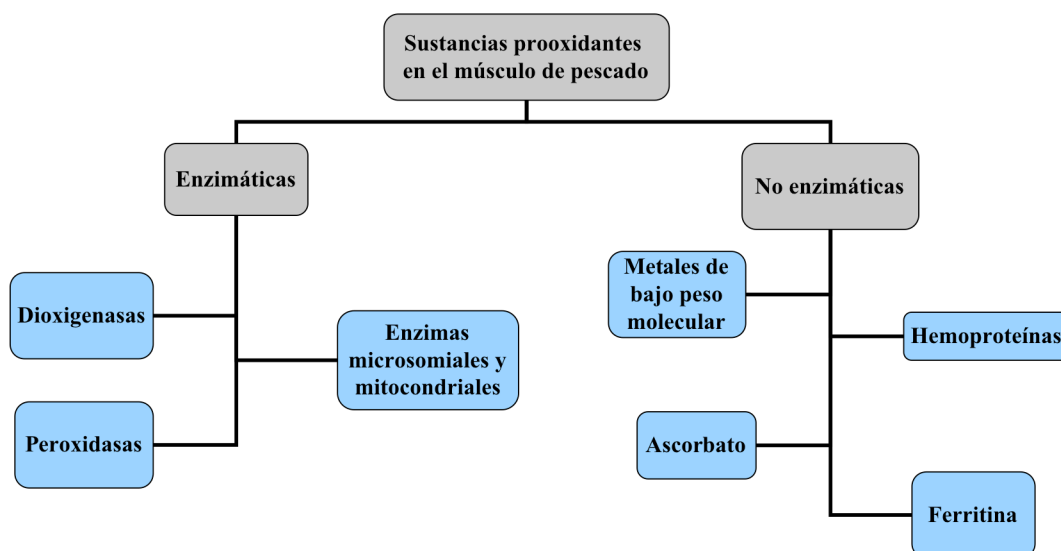


Figura 10: Sustancias catalizadoras de la oxidación lipídica presentes en el músculo de pescado.

3.1.1. Componentes enzimáticos

3.1.1.1. *Dioxigenasas*

Las Dioxigenasas catalizan reacciones en las que los dos átomos de una molécula de oxígeno se adhieren a un ácido graso. En este grupo están contenidas las Lipoxigenasas (LOX) y las Ciclooxygenasas (COX). Como se ha señalado en el apartado 2.3.2, las LOX insertan específicamente una molécula de oxígeno en la parte de un ácido graso insaturado que contenga el grupo 1,4-cis-pentadieno (Harris & Tall, 1989) para formar hidroperóxidos conjugados. Son numerosos los estudios sobre LOX realizados en las branquias y en la piel de diferentes peces (German, Chen & Kinsella, 1985, German & Creveling, 1990, Hsieh, German & Kinsella, 1988, Josephson, Lindsay & Stuber, 1984, Liu & Pan, 2004, Mohri, Cho, Endo & Fujimoto, 1992, Saeed, 2001). Las COX son LOX que incorporan moléculas de oxígeno específicamente en el ácido araquidónico (Yamamoto, 1991).

3.1.1.2. *Enzimas microsomiales y mitocondriales*

Son sistemas enzimáticos asociados a los microsomas y a las mitocondrias y catalizan la formación de hierro ferroso (Fe^{2+}), que a su vez cataliza la oxidación lipídica. La enzima transfiere un electrón del NADPH o NADH a una molécula de oxígeno dando lugar a la formación de O_2^{\bullet} que a su vez reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Kanner, 1994).

3.1.1.3. *Peroxidasas*

Son enzimas capaces de catalizar la iniciación de la oxidación lipídica en presencia de H_2O_2 y haluros tales como bromuro o yoduro (Kanner & Kinsella, 1983).

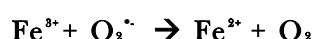
3.1.2. Componentes no enzimáticos

3.1.2.1. *Metales*

Los metales de transición tienen un rango de estados de oxidación que los convierten en compuestos con capacidad para transferir electrones y catalizar reacciones redox. Entre éstos, el hierro y el cobre son los que tienen una mayor actividad en el músculo de pescado. Ambos tienen baja solubilidad en sistemas acuosos por lo que se encuentran en forma de complejos con ADP, ATP, aminoácidos o ascorbato (Hultin et al., 1994). En el caso del hierro, estos complejos se

denominan hierro de bajo peso molecular (Fe-LMW). Los metales pueden producir radicales por tres mecanismos (Frankel, 1998):

- 1) Mediante la **reacción de Haber-Weiss** por la cual, a partir del ión $O_2^{\bullet -}$ y el H_2O_2 , se generan radicales $\bullet OH$, que son extremadamente reactivos y participan de manera importante en las fases de iniciación y propagación de la oxidación lipídica. La reacción, que consta de dos etapas, es muy lenta pero puede ser catalizada por el hierro. En una primera etapa se produce la reducción del hierro férrico a ferroso:



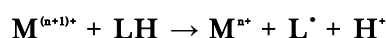
En la segunda etapa, el hierro ferroso reacciona con el agua oxigenada para dar lugar a los radicales hidroxilo, que está considerado como uno de los primeros iniciadores de la oxidación lipídica en tejidos biológicos. Ésta, es la conocida como **reacción de Fenton**:



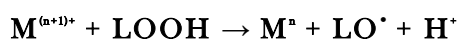
La reacción global resultante es:



- 2) Catalizando directamente la rotura homolítica de ácidos grasos.



- 3) Mediante la catálisis de las reacciones de descomposición de hidroperóxidos.



Este último mecanismo es muy importante ya que la rápida descomposición de hidroperóxidos acelera la formación de compuestos volátiles responsables de los olores desagradables asociados a la rancidez.

En el caso del hierro de bajo peso molecular (Fe-LMW), el estado de oxidación +2 (hierro ferroso) es el más prooxidante y puede ser producido a partir de hierro férrico (Fe^{3+}), estado habitual en el que se encuentra en músculo de pescado, con especies reductoras como el ascorbato, diferentes radicales libres o las enzimas microsomiales y mitocondriales.

3.1.2.2. Hemoproteínas

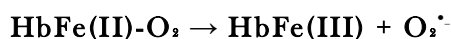
Las hemoproteínas son un grupo de proteínas que contienen al grupo prostético hemo unido fuertemente a una cadena polipeptídica. Se consideran los mayores catalizadores de la oxidación lipídica, sobre todo en las especies grasas de pescado como la caballa, el jurel, el atún o la sardina (Erickson, 2002) donde son más abundantes. La Hb es el compuesto mayoritario y se encuentra tanto en la sangre como en el músculo, siendo su principal función el transporte de oxígeno. La mioglobina se encuentra solamente en el músculo y su función es la de almacenamiento de oxígeno. Estructuralmente, la Hb es un tetrámero formado por cuatro cadenas peptídicas, conteniendo en cada una de ellas un grupo hemo (un átomo de Fe unido a un grupo pirrol) mientras que la mioglobina solamente está formada por 1 monómero. Cuando una molécula de oxígeno está enlazada al hierro el complejo resultante se denomina **oxihemoglobina (oxiHb)** u **oximioglobina**, mientras que las moléculas sin oxígeno enlazado se denominan **desoxihemoglobina (desoxiHb)** y **desoximioglobina** respectivamente. Tras la muerte del pescado casi todo el hierro contenido en los grupos hemo está en estado de oxidación +2.

Las hemoproteínas puede promover la oxidación lipídica en músculo de pescado mediante diversos mecanismos (Pazos, Medina & Hultin, 2005):

1) Pueden descomponer los hidroperóxidos lipídicos, generando radicales libres (Frankel, 1998).

2) Pueden actuar como fotosensibilizadores del oxígeno (Kolakowska, Olley & Dunstan, 2000). En este proceso, las hemoproteínas son excitadas tras la absorción de luz, pasando a un estado excitado, capaz de convertir el oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) a oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que se adiciona rápidamente a una molécula de PUFA generando un hidroperóxido lipídico.

3) Las hemoproteínas contenidas en el músculo pueden autooxidarse pasando del estado de oxidación +2 a estado de oxidación +3, dando lugar a la formación de **metahemoglobina (metHb)** y del radical superóxido (Richards, Modra & Li, 2002).



El anión superóxido formado ($\text{O}_2^{\cdot-}$) puede dar lugar a la formación de H_2O_2 mediante dismutación ($\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$), y éste, mediante la reacción de Fenton con ión ferroso, formar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que, como se ha indicado anteriormente, está considerado como uno de los primeros iniciadores de la oxidación lipídica en tejidos biológicos (Halliwell & Gutteridge, 1986).

Por otro lado, la metHb o la metamioglobina pueden ser activadas por reacción con el H_2O_2 dando lugar a la formación de perferrilhemoglobina, radical muy inestable que se reduce rápidamente a ferrilhemoglobina (Baron & Andersen, 2002).



Las especies perferrilo son capaces de iniciar la oxidación mediante abstracción de hidrógeno a un PUFA (Kanner & Harel, 1985). Diversos estudios sugieren que además del H_2O_2 , los hidroperóxidos lipídicos estarían implicados en el mecanismo prooxidante de la metHb (Kanner, 1994).

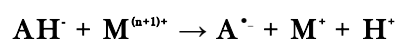
La reacción de autooxidación de las hemo- y mioglobinas es por tanto la primera etapa del mecanismo de catálisis. Diversos trabajos han conseguido correlacionar la formación de metHb y el deterioro lipídico del músculo de pescado (Undeland, Kristinsson & Hultin, 2004, Wetterskog & Undeland, 2004). Se ha comprobado que la velocidad de esta reacción es dependiente del tipo de hemoproteína (Richards, Modra & Li, 2002), su concentración en el músculo (Richards & Hultin, 2002), el grado de oxigenación y pH del medio (Pazos, Medina & Hultin, 2005), o aspectos estructurales como la protección del grupo hemo por la estructura proteica (Jensen, Fago & Weber, 1998).

3.1.2.3. Ferritina

La Ferritina es una proteína, que puede almacenar hasta 4500 iones de hierro, mientras que no es necesitado en los procesos sintéticos de la célula (Frankel, 1998). Este hierro puede ser liberado en presencia de especies reductoras, como el ión superóxido, dando lugar a la formación de Fe-LMW que es un potencial catalizador de la oxidación lipídica (Seman, Decker & Crum, 1991).

3.1.2.4. Ascorbato

El ascorbato o Vitamina C presente en el músculo de pescado, puede actuar como antioxidante o prooxidante, siendo esta actividad dependiente de su concentración y del contenido de otras sustancias en el medio. Los efectos prooxidantes del ácido ascórbico han sido a menudo explicados por su capacidad para reducir iones metálicos como hierro, cobre o cobalto, cuya forma reducida es más activa en la descomposición homolítica de hidroperóxidos.



La forma reducida de los iones metálicos cataliza la descomposición de hidroperóxidos a radicales alcoxi que continúan la secuencia de reacciones de oxidación. El efecto prooxidante del ascorbato fue observado por Vargas (2001) en músculo de tilapia congelado o por Laudicina & Marnett (1990) en microsomas de hígado de rata. Otros estudios sugieren la dependencia de la actividad con la concentración afirmando que el ascorbato puede ser antioxidante a altas concentraciones y prooxidante a concentraciones reducidas (Hultin, 1992).

3.2. Sistema antioxidante endógeno

El alto grado de insaturación de los ácidos grasos presentes en el músculo de pescado lo convierten en uno de los alimentos más susceptibles a la oxidación lipídica. Para combatir los procesos oxidativos, los peces poseen un mecanismo antioxidante endógeno que se puede dividir en dos grupos (Fig. 11). El primero está formado por distintas enzimas capaces de neutralizar la actividad de los ROS o RNS y el segundo por compuestos químicos, habitualmente de bajo peso molecular, capaces de atrapar radicales libres, comúnmente denominados “verdaderos antioxidantes”. Tras ejercer su actividad, los verdaderos antioxidantes, son regenerados a sus formas activas mediante diversos sistemas reductores cuya actividad cesa tras la muerte del pescado.

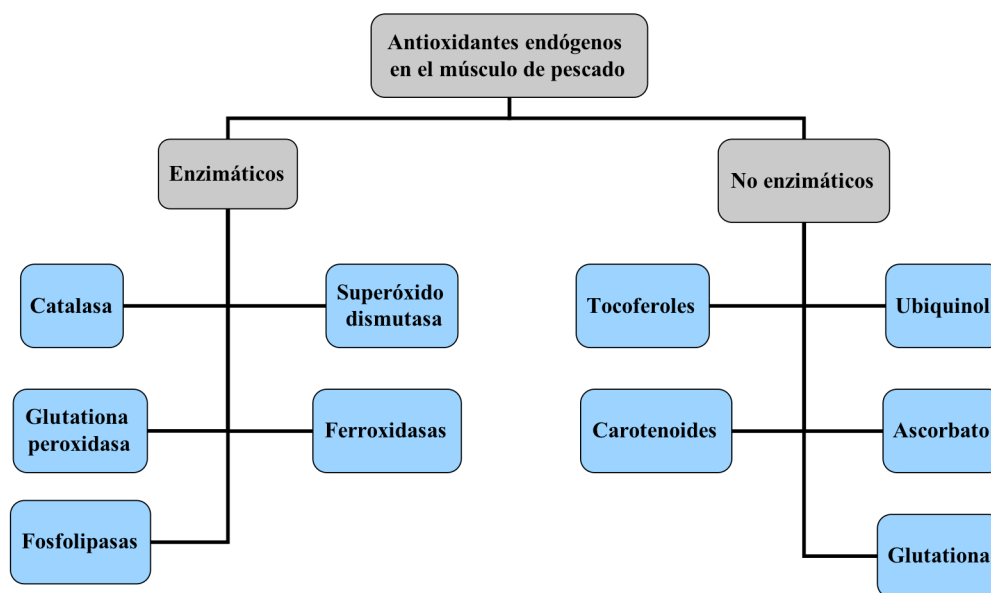


Figura 11: Sistema antioxidante endógeno en el músculo de pescado.

3.2.1. Antioxidantes enzimáticos

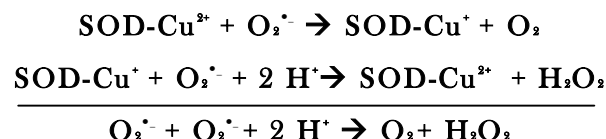
Las células de los tejidos biológicos poseen sistemas enzimáticos que actúan como protectores de la oxidación mediante la inactivación de sustancias potencialmente iniciadoras como las ROS (O_2^{\bullet} , el H_2O_2 , $\bullet OH$...), o manteniendo los metales de transición, potenciales catalizadores de la oxidación, en su estado de oxidación más inactivo. A continuación se enumeran las enzimas más importantes.

3.2.1.1. Catalasa

La catalasa es una enzima situada en los peroxisomas de las células y su función es la de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dando lugar a la formación de oxígeno molecular y agua ($H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$). El peróxido de hidrógeno no es especialmente reactivo por sí solo, sin embargo es un importante precursor de otras sustancias radicalarias más reactivas como el radical hidroxilo ($\bullet OH$).

3.2.1.2. Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloenzima que actúa como inhibidor preventivo de la oxidación lipídica catalizando la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) en H_2O_2 y O_2 mediante el mecanismo que se detalla a continuación:

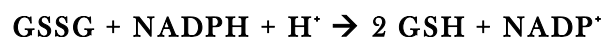


3.2.1.3. Glutación peroxidasa

La glutatión peroxidasa es una metaloenzima que actúa durante la etapa de propagación del mecanismo de oxidación. Está localizada en la mitocondria y en el citosol de las células del músculo de pescado. Cataliza la reducción del hidrógeno de los peróxidos lipídicos (LOOH) y el peróxido de hidrógeno por medio del antioxidante glutatióna (GSH).



La glutatióna oxidada (GSSG) es luego reducida de nuevo a GSH, reacción catalizada por la enzima glutatióna reductasa actuando el NADPH como agente reductor.



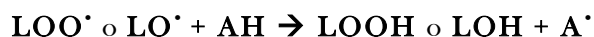
A diferencia de la catalasa, la GSH es capaz de reaccionar tanto con los hidroperóxidos lipídicos como con el peróxido de hidrógeno.

3.2.1.4. Ferroxidasas

Son enzimas catalizadoras de la oxidación del óxido ferroso a férrico en presencia de oxígeno.

3.2.2. Antioxidantes endógenos no enzimáticos

Son los llamados “verdaderos antioxidantes” ya que intervienen directamente en la cadena de formación de los radicales libres, convirtiendo los hidroperóxidos y los radicales en compuestos estables, inactivando los radicales lipídicos formados y dando lugar a la formación de un radical de baja energía derivado del “scavenger”.



La efectividad de estos antioxidantes es dependiente de sus propiedades químicas como las energías de enlace, la posibilidad de formación de distintas formas resonantes del radical formado y la susceptibilidad a la oxidación, que viene dada por el valor de su potencial de reducción. Otro aspecto importante es la solubilidad en distintos medios ya que los radicales responsables del deterioro lipídico se forman tanto en la parte lipofílica de las células (rotura de peróxidos o hidroperóxidos lipídicos) como en el citosol (peróxido de hidrógeno, superóxido,...). Entre los “scavengers” de tipo lipofílico destacan los tocoferoles, la ubiquinona y los carotenoides mientras que el ascorbato, los tioles (glutathione) y varios tipos de compuestos nitrogenados son los más importantes entre los hidrofílicos (Fig 12).

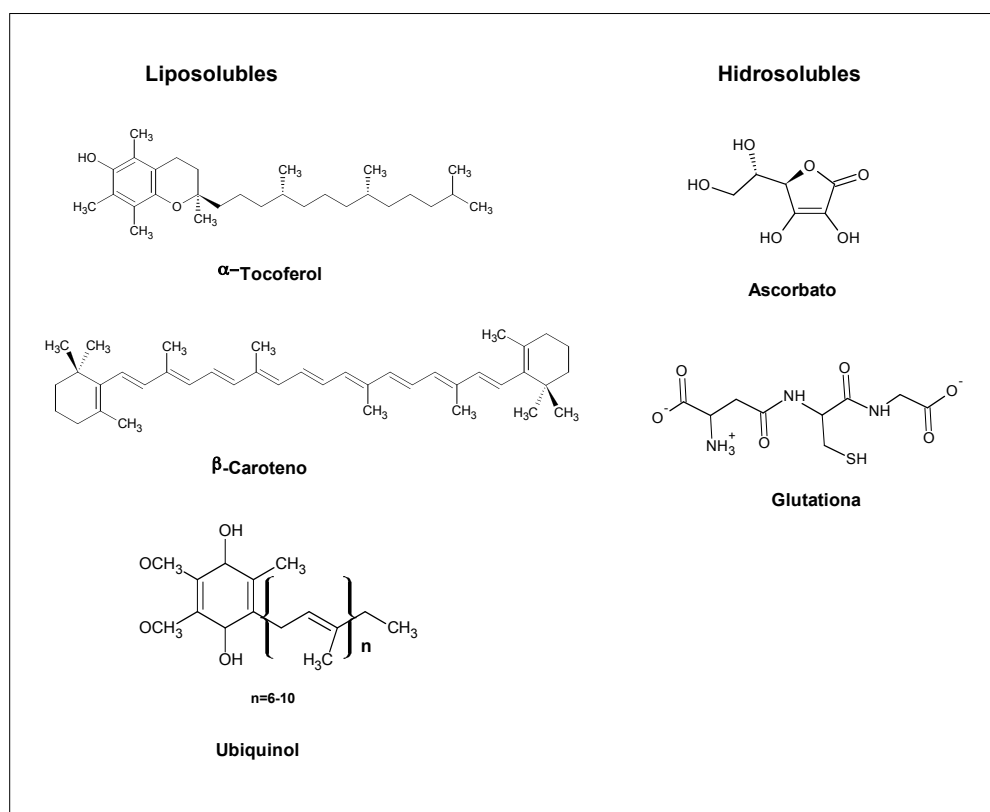


Figura 12: Estructuras químicas de los principales antioxidantes endógenos

3.2.2.1. Tocoferoles

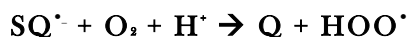
Los tocoferoles son probablemente los principales antioxidantes liposolubles del músculo de pescado. El α -tocoferol es el isómero con mayor actividad (Niki, 1996) y tan solo uno de los cuatro diferentes isómeros (α -, β -, δ - y γ -) que difieren en el número y posición de los grupos metilo enlazados al anillo fenólico. La actividad antioxidante del tocoferol se debe a su estructura fenólica que es capaz de estabilizar el radical tocoferoxilo resultante. Actúa neutralizando los radicales peroxilo (LOO^\bullet) dando lugar a la formación del radical tocoferoxilo y distintos compuestos no radicales. La formación de unos u otros productos depende del nivel de oxidación. Cuando las velocidades de oxidación son lentas los radicales formados se convierten tocoferilquinonas. El radical tocoferoxilo es relativamente estable debido a que el electrón desapareado está fuertemente deslocalizado a lo largo del anillo aromático (Decker, Livisay & Zoy, 2000). Puede reaccionar con otro radical tocoferoxilo para formar un dímero más estable o ser reducido por otros antioxidantes como ascorbato o glutathiona para volver a regenerar la molécula de tocoferol (Niki, Tsuchiya, Tanimura & Kamiya, 1982).

3.2.2.2. Ubiquinona

La ubiquinona o Coenzima Q es un compuesto de naturaleza liposoluble que se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial de las células. Este aspecto es importante en el músculo rojo del pescado donde las mitocondrias pueden llegar a suponer el 45 % del volumen total de la célula. La forma reducida neutraliza radicales peroxilo, pero de una manera menos efectiva que el α -tocoferol. Otro mecanismo antioxidante de este compuesto es la regeneración del α -tocoferol a partir del radical tocoferoxilo (Kagan Nohl & Quinn, 1996).



Pero al igual que otros antioxidantes, la ubiquinona pueden comportarse como un prooxidante. La ubisemiquinona (SQ^{\bullet}), un intermediario del ciclo redox de la ubiquinona, puede generar radicales implicados posteriormente en la oxidación lipídica (Kagan, Nohl & Quinn, 1996).

**3.2.2.3. Carotenoides**

Los carotenoides son un numeroso grupo de compuestos (más de 600), aunque se estima que solamente unos 50 tienen actividad biológica. Son compuestos liposolubles pero pueden encontrarse en sistemas acuosos enlazados a proteínas. Son los responsables de la coloración amarilla, naranja o roja de la piel, caparazón o exoesqueleto de diversas especies de pescados y mariscos. La astaxantina (Fig. 13) es probablemente el pigmento más importante encontrado en la biota marina y se ha detectado en un numeroso grupo de animales marinos como la langosta, el cangrejo, el camarón o el salmón. En el pescado se pueden encontrar en la piel, el músculo, las gónadas, el hígado y en los ojos.

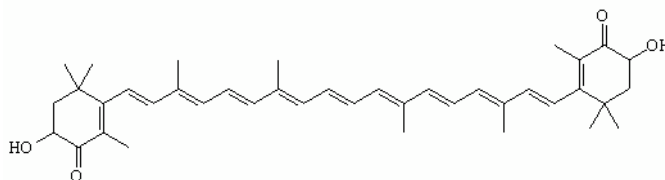
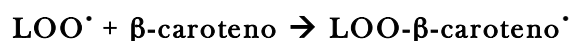


Figura 13: Estructura química de la Astaxantina

La actividad antioxidante de los carotenoides se basa en la desactivación de radicales libres. El sistema de deslocalización electrónica hace a este tipo de compuestos muy susceptibles a la oxidación y por tanto al ataque de radicales peroxilo y otros agentes electrófilos. Los radicales peroxilo no son capaces de abstraer un hidrógeno de los carotenoides, así que el mecanismo antioxidante se lleva a cabo de manera distinta a la de los compuestos fenólicos. Como un ejemplo, el β -caroteno actúa mediante un mecanismo donde el radical peroxilo es adicionado al sistema conjugado de la molécula del carotenoide.



El radical formado puede reaccionar con otro radical para formar un producto estable, atacar a otra molécula de β -caroteno, o atacar a un sustrato lipídico para generar otro radical. Por lo tanto el β -caroteno puede actuar como antioxidante o como prooxidante y su comportamiento va a ser muy sensible a la presión de oxígeno (Britton, 1995).

Los carotenoides son buenos protectores de la oxidación lipídica catalizada por la luz ya que interfieren en la activación del oxígeno triplete a oxígeno singlete. El β -caroteno no es destruido en este proceso, ya que regresa al estado fundamental disipando la energía en forma de calor. Se estima que una molécula es capaz de evitar la formación de unas 100 moléculas de oxígeno singlete.

3.2.2.4. Ascorbato

El ácido ascórbico es una molécula químicamente simple, hidrosoluble y se encuentra en forma desprotonada (ascorbato) bajo condiciones fisiológicas (Sies & Stahl, 1995). Puede dar lugar, mediante una reacción reversible en dos pasos, a su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (Fig. 14).

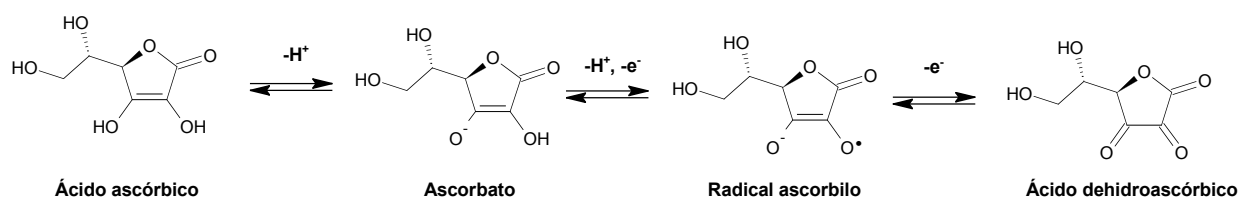


Figura 14: Formación del ácido dehidroascórbico.

El radical ascorbilo actúa como intermediario en esta reacción (Fig. 14). El ascorbato es un excelente agente reductor ya que la pérdida de un electrón en procesos redox con radicales lipídicos da lugar a la formación del radical semidehidroascorbato que es relativamente estable debido a la deslocalización del electrón desapareado. Esta reacción es fuertemente dependiente del pH y la presencia de metales catalizadores (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Las propiedades antioxidantes del ascorbato se basan en su capacidad reductora sobre los peróxidos lipídicos, en su capacidad para quelatar y neutralizar la acción catalítica de metales, y en su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno como el oxígeno singlete o el radical superóxido. De acuerdo con Buettner & Jurkiewicz (1996) el reducido valor del potencial reductor que presenta el ascorbato le permite neutralizar otros radicales con valores superiores como $\cdot\text{OH}$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{GS}\cdot$ o el radical tocoferoxilo.



Este último aspecto es muy importante en la actividad antioxidante del ascorbato ya que diversas publicaciones describen un efecto sinérgico de los sistemas antioxidantes binarios α -tocoferol/ascorbato en la inhibición de la rancidez, atribuido fundamentalmente a la capacidad del ascorbato para regenerar tocoferol (Niki, Tsuchiya, Tanimura & Kamiya, 1982). Se cree que el ascorbato actúa reduciendo el radical tocoferoxilo y produciendo el radical ascorbilo ($\text{Asc}\cdot$) (Petillo, Hultin, Krzynowek & Autio, 1998). Posteriormente, a partir del ión $\text{Asc}\cdot$ se forman por dismutación el ión $\text{AscH}\cdot$ y ácido dehidroascórbico (Buettner, 1993). Tanto el ácido dehidroascórbico como el ión $\text{Asc}\cdot$ pueden ser reducidos mediante sistemas enzimáticos por agentes reductores como NADH o NADPH (Fig 15).

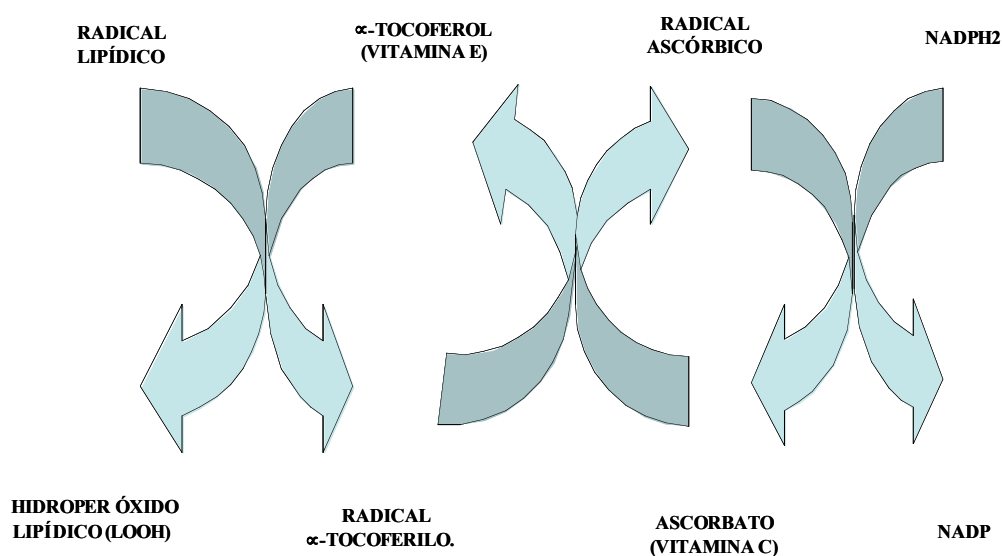


Figura 15: Mecanismo de regeneración de tocoferol por parte del ácido ascórbico.

El hecho de que el ascorbato sea un antioxidante hidrosoluble, al contrario que el tocoferol, sugiere que en los sistemas biológicos no habría interacciones entre ambos. Sin embargo, se ha comprobado que en las membranas celulares, la parte activa fenólica del tocoferol se sitúa en la interfase agua/membrana lipídica permitiendo la interacción entre ambos compuestos.

Al igual que otras sustancias con actividad antioxidante, el ascorbato puede comportarse como un prooxidante, como se indica en el apartado 3.1.2.4., dependiendo de la concentración y de la presencia de otras sustancias implicadas en procesos redox.

3.2.2.5. Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados no clasificados como proteínas comprenden entre el 0,5 y el 1 % del peso total de músculo de pescado (Spinelli & Dassow, 1982). Ciertos péptidos, aminos, aminoácidos o nucleótidos se comportan como antioxidantes, generalmente de manera sinérgica con los antioxidantes primarios o como importantes agentes quelatantes. Erickson & Hultin (1992) demostraron que la histidina, un aminoácido libre presente en músculo de pescado, es capaz de inhibir la actividad antioxidante del hierro de bajo peso molecular disminuyendo, por tanto, la actividad de uno de los más importantes catalizadores de la oxidación lipídica. Chan, Faustman & Decker (1997) demostraron la capacidad quelatante del dipéptido carnosina (beta-alanil-L-histidina) sobre el Cu^{2+} , además de su capacidad para reducir la formación de productos secundarios de la oxidación. Por último, algunas poliaminas como la putrescina, espermidina y espermina inhiben la

oxidación lipídica mediante la inactivación de radicales libres o la inhibición de las reacciones catalizadas por el hierro (Decker, 1998).

3.2.2.6. Glutathiona

La glutathiona es un antioxidante hidrosoluble cuya estructura se compone de un tripéptido lineal constituido por tres aminoácidos: Glicina, ácido glutámico y cisteína, siendo el grupo tiol de la cisteína, el responsable de sus propiedades antioxidantes. La forma reducida de la glutathiona (GSH) puede ceder un átomo de hidrógeno a los radicales libres (Buettner, 1993). Esta reacción está catalizada por la enzima glutathiona peroxidada dando lugar a la formación de radicales glutanionilo (GS[•]) que se condensan para formar dímeros (GSSG). La glutathiona puede ser regenerada mediante la acción de la glutathiona reductasa en presencia de NADH o NADPH. Además de su capacidad para neutralizar radicales libres, la glutathiona también puede actuar como reductor de los hidroperóxidos lipídicos.

4. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA EXTENSIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES

4.1. Generalidades

Para evaluar la extensión del deterioro lipídico en productos derivados de la pesca se han utilizado numerosos procedimientos, que se podrían dividir en tres grupos: los métodos que miden el consumo de oxígeno, los que cuantifican compuestos cuya concentración disminuye con la oxidación y los que miden la formación de productos derivados de la oxidación. No existe ninguna metodología con la que se puedan evaluar simultáneamente todas las etapas de la oxidación. Por ello, para una correcta evaluación del deterioro oxidativo se hace necesaria la utilización de al menos dos de estas técnicas que midan la formación o desaparición de compuestos relacionados con el deterioro oxidativo, en distintas etapas del proceso incluyendo la medida de productos primarios de la oxidación (como los hidroperóxidos), los productos de descomposición (malondialdehído o volátiles) o los productos de interacción (fluorescencia) (Frankel, 1998).

Una de las técnicas utilizadas para el seguimiento de la oxidación lipídica es la **medida de consumo de oxígeno**. La muestra es sellada bajo una atmósfera de aire u oxígeno y almacenada a temperatura constante. La concentración de oxígeno contenido en el espacio de cabeza, uno de los

reactivos del proceso oxidativo, se monitoriza periódicamente. Debido a que miden la desaparición de uno de los reactantes del proceso de oxidación, estos métodos presentan una sensibilidad muy limitada y requieren altos grados de oxidación para la determinación de los tiempos de inducción (Frankel, 1998).

La **evaluación de la variación de los ácidos grasos** es un ejemplo de metodología basada en la medida de compuestos que desaparecen con la oxidación. Estos procedimientos se basan en que la velocidad relativa de oxidación de los PUFAs se relaciona casi en progresión geométrica con el número de dobles enlaces, pudiéndose medir el descenso en los niveles de estos ácidos. Entre las desventajas de esta estrategia destacan la complejidad del método y el reducido porcentaje de ácidos grasos que desaparecen durante el deterioro lipídico, y que dan lugar a la formación de olores y sabores asociados a la rancidez, lo que lo convierte en un método muy poco sensible (Labuza, Silver, Cohn, Heidelbaugh & Karel, 1971). Además, se han observado cambios en los niveles de PUFAs no provocados por procesos oxidativos, sino por la interacción entre proteína-lípido a lo largo de diversas etapas de procesamiento. El **seguimiento del consumo de antioxidantes endógenos** es otra estrategia basada en la desaparición de compuestos como consecuencia de la oxidación. Diversos trabajos han conseguido correlacionar la evolución de desaparición de antioxidantes endógenos con otros métodos clásicos de oxidación. Destaca el seguimiento del tocoferol (Pazos, González, Gallardo, Torres & Medina, 2005, Pazos, Sánchez & Medina, 2005), ácido ascórbico (Undeland, Hall & Lingnert, 1999) o glutatión (Pazos, González, Gallardo, Torres & Medina, 2005).

Sin duda, los métodos más utilizados son los que evalúan la aparición de productos derivados del deterioro lipídico. El **índice de peróxidos (PV)** (Chapman & Mackay, 1949) evalúa la evolución de los productos primarios de oxidación y puede medirse de una manera sencilla mediante técnicas espectrofotométricas. En situaciones donde la oxidación ocurre de manera acelerada, como en pescado sometido a procesamiento térmico, se produce una acumulación de productos secundarios de la oxidación debido a la rápida descomposición de los primarios. En estos casos, y en etapas avanzadas de la oxidación, PV no es un método adecuado de seguimiento del deterioro lipídico (Ross & Smith, 2006) ya que muestra una estimación incorrecta del grado de oxidación.

Los métodos que evalúan la aparición de productos secundarios son el **índice de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)** (Vyncke, 1970), el **índice de p-anisidina** o la **medida de compuestos volátiles**, como aldehídos, cetonas, alcoholes, furanos o hidrocarburos, formados tras la descomposición de los productos primarios. TBARS es

uno de los métodos más antiguos para la evaluación de la oxidación lipídica (Ladikos & Lougovois, 1990). Se basa en la reacción de una molécula de malondialdehído, producto secundario de la oxidación, con dos moléculas de TBA para formar el complejo coloreado malondialdehído-TBA, que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Entre las ventajas de este método destaca su simplicidad y su alta correlación con la detección sensorial de la rancidez (Igene, King, Pearson & Gray, 1979). Su mayor desventaja es que no es específico para malonaldehído ya que otros compuestos, incluso no relacionados con la oxidación lipídica, pueden reaccionar con el TBA, dando lugar a una sobreestimación de la oxidación (Gray, 1992). El **índice de p-anisidina** (AOCS, 1998), es una técnica colorimétrica utilizada mayoritariamente para el seguimiento de la oxidación lipídica en aceites. Mide los niveles de aldehídos, principalmente 2,4-alcadienales y 2-alquenes utilizándolos como un indicador del deterioro oxidativo. Una alícuota de la muestra se disuelve en isooctano y posteriormente se hace reaccionar con una disolución de p-anisidina en ácido acético. Los productos de reacción son medidos mediante lectura espectrofotométrica a 350 nm. Entre las ventajas de este método destacan su sencillez y rapidez. Sin embargo, algunos trabajos (Jacobsen, 1999, Schnepf, Spencer & Carlort, 1991) señalan la escasa sensibilidad de este índice para detectar la oxidación en aceites de pescado. Debido a las limitaciones de estos dos métodos, el análisis de compuestos volátiles se ha convertido en una metodología muy popular para el seguimiento del deterioro lipídico, como se describirá posteriormente.

Por último, la **medida de fluorescencia** se basa en la detección de los compuestos fluorescentes que se forman tras la interacción de grupos carbonilos procedentes de productos secundarios de la oxidación (aldehídos, cetonas, alcoholes,...) con los constituyentes del músculo que contienen un grupo amino (Aubourg, 1999). Habitualmente es usada como una técnica complementaria a otros índices de seguimiento de la oxidación lipídica ya que tan solo es una técnica útil en estados avanzados de la oxidación. Lubis & Buckle (1990) encontraron una correlación entre la determinación de compuestos terciarios de la oxidación mediante fluorescencia y la detección sensorial de la rancidez en muestras de sardina. Hasegawa, Endo & Fujimoto (1992) demostraron la correlación existente entre el seguimiento de la oxidación lipídica mediante fluorescencia y los índices PV, TBARS y consumo de oxígeno en músculo de pescado seco y congelado.

4.2. Análisis de compuestos volátiles para el seguimiento de la oxidación lipídica en productos derivados de la pesca.

Las características organolépticas de un alimento son un parámetro fundamental en cuanto a su aceptabilidad por parte del consumidor, dada la importancia de los volátiles asociados a la oxidación en la aceptación o rechazo de un alimento. Por ello, el estudio de los compuestos volátiles asociados a estos aromas o sabores es importante en el diseño de estrategias destinadas a preservar la calidad del alimento desde el punto de vista organoléptico.

El análisis de los compuestos volátiles en alimentos es una tarea complicada debido a la presencia de estos analitos en muy bajas concentraciones y en matrices habitualmente muy complejas. En general, se podrían definir cuatro etapas que se llevan a cabo en matrices alimentarias:

- 1^a.- Separación de la fracción volátil de la materia no volátil.
- 2^a.- Concentración.
- 3^a.- Separación de los constituyentes volátiles.
- 4^a.- Identificación.

Lo más habitual en las dos primeras etapas es aprovechar la volatilidad de los analitos utilizando técnicas de extracción de espacio de cabeza (HS) o destilación. Otras técnicas de separación, como la extracción con disolventes o técnicas de adsorción, aprovechan la alta polaridad con respecto al resto de los componentes de la muestra. Las técnicas cromatográficas, acopladas a espectrometría de masas (MS) son las más utilizadas en las etapas de separación e identificación.

La elección del método apropiado depende de las características físico-químicas de los componentes volátiles de interés, de su concentración en el producto, del rango de puntos de ebullición, de la estabilidad térmica y oxidativa de los compuestos y de la polaridad.

4.2.1. Técnicas de extracción y concentración

4.2.1.1. Técnicas de destilación y extracción con disolventes.

La utilización de estas técnicas se basa en que la mayoría de los compuestos volátiles son considerablemente menos polares que los componentes de la matriz. A menudo, tras la extracción de los analitos con disolventes orgánicos es necesaria una etapa adicional de limpieza del extracto para la separación del residuo no volátil. Para ello se suele utilizar la destilación o la destilación a vacío (Sen, 1991) o las técnicas de espacio de cabeza (Buttery, Stern & Ling, 1994). Una alternativa a esta metodología es la realización de una destilación inicial sobre la muestra seguida de una extracción con disolvente del destilado acuoso. Este proceso combinado se denomina destilación-

extracción simultánea con disolventes (SDE) y se puede llevar a cabo con el aparato diseñado por Likens & Nickerson (1964) que permite la realización simultánea de ambas etapas. Estas técnicas requieren múltiples pasos, una gran cantidad de tiempo y presentan la desventaja de la imposibilidad de automatización (Wilkes, Conte, Kim, Holcomb, Sutherland & Miller, 2000). A menudo no se consiguen recuperaciones cuantitativas de los compuestos más polares debido a su afinidad por el agua o de los más apolares cuando su afinidad por la muestra es dependiente de la cantidad de grasa. Sin embargo, se considera una buena técnica para la determinación de los compuestos responsables del aroma del pescado con una volatilidad relativamente baja. Varlet, Knockaert, Prost & Serot, (2006) compararon los volátiles de salmón fresco y ahumado mediante SDE encontrando diversas diferencias entre los analitos de ambas matrices relacionadas con el procesado de ahumado. Zhang (1997) utilizaron la SDE y GC-MS para la determinación analítica de volátiles en muestras de caballa durante el almacenamiento en hielo. Determinaron hasta 62 compuestos relacionados mayoritariamente con la oxidación lipídica y la degradación microbiana.

4.2.1.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es un proceso de separación que hace uso del aumento en el poder de solvatación de ciertos fluidos, cuando estos se encuentran por encima de su presión crítica y de su temperatura crítica, para fraccionar mezclas de compuestos o separar compuestos orgánicos de componentes inorgánicos. Las mayores ventajas de esta técnica son el uso de disolventes no contaminantes y la posibilidad de utilizar condiciones de extracción con un riesgo mínimo de formación de artefactos. SFE utiliza varios fluidos para la realización de la extracción pero sin duda el más utilizado es el CO₂, en ocasiones modificado con otros disolventes orgánicos; además de altas presiones (entre 2000 y 4000 p.s.i.) y elevadas temperaturas (Wilkes, Conte, Kim, Holcomb, Sutherland & Miller, 2000). La principal ventaja de la utilización de SFE es que generalmente se obtienen extractos limpios con solo trazas de disolventes orgánicos, por lo que en numerosas ocasiones no es necesario añadir una etapa de limpieza de los extractos. A menudo no se consiguen recuperaciones cuantitativas de los compuestos más polares debido a su afinidad por el agua o de los más apolares cuando su afinidad por la muestra es dependiente de la cantidad de grasa. Las desventajas de esta técnica son la fuerte dependencia de la eficacia de la extracción con la matriz de la muestra, y el requerimiento de operadores expertos para llevarla a cabo. Roh, Park, Park & Chun (2006) determinaron los volátiles de muestras de aceite de atún mediante SFE y GC-MS, mientras que Aro, Brede, Manninen & Kallio (2002) utilizaron esta técnica para la determinación de los compuestos responsables de los olores de arenque crudo y cocido. Tras la

extracción, los autores utilizaron la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), como etapa de limpieza, para la extracción de los lípidos contenidos en el extracto antes de la determinación analítica mediante GC-MS.

4.2.1.3. *Espacio de cabeza estático (SHS)*

Las técnicas de espacio de cabeza en general, y la técnica de espacio de cabeza estático en particular, han sido ampliamente utilizadas para determinar los cambios en la fracción volátil o el aroma durante el almacenamiento o procesado de los alimentos. La técnica se basa en el aislamiento de volátiles mediante la extracción de un volumen de aire del espacio libre sobre un recipiente, seguido de una inyección directa en un cromatógrafo de gases. La obtención de un estado de equilibrio entre la muestra y la fase vapor es un requisito fundamental para la realización de análisis cuantitativos. La utilidad de este sistema de inyección depende de que existan suficientes cantidades de analito en el volumen de gas que se inyecta para la detección mediante cromatografía gaseosa. Quizá sea el más representativo de los análisis de la composición de la fracción volátil (Alberola & Izquierdo, 1978), ya que contiene los volátiles responsables del olor, en las concentraciones y relaciones en las que son percibidas por la nariz humana. En comparación con las técnicas anteriormente descritas, y teniendo en cuenta la existencia de inyectores automáticos comerciales, SHS resulta una técnica muy simple en la que se reduce considerablemente el tiempo empleado en la preparación de muestra. Sin embargo, además de su limitada sensibilidad, esta metodología, muestra un rango de compuestos susceptibles de determinación más limitado que SDE o SFE ya que es muy discriminante en cuanto a la volatilidad de los analitos (Wilkes, Conte, Kim, Holcomb, Sutherland & Miller, 2000). Joaquin, Tolasa, Oliveira, Lee & Lee (2008) utilizaron esta técnica para la determinación de compuestos volátiles en músculo de arenque durante el almacenamiento en estado congelado, con el objeto de evaluar el efecto de una proteína de leche en el retardo de la oxidación lipídica. Medina, Satué-Gracia & Frankel (1999) estudiaron la formación de volátiles en muestras de músculo de pescado sometidas a un proceso térmico. Los volátiles acetaldehído, propanal, heptano, pentanal, hexanal y 2-etilfurano fueron los que se formaron mayoritariamente siendo el análisis de este último el que mejores correlaciones obtuvo con otros índices para la determinación de la oxidación lipídica como PV y TBARS. Oliveira, Crapo, Himelbloom, Vorholt & Hoffert (2005) utilizaron SHS para caracterizar los volátiles presentes en salmón mientras que Girard & Nakai (1993, 1994) consiguieron diferenciar especies de salmón enlatado y evaluar su calidad mediante el análisis de los volátiles utilizando SHS.

4.2.1.4. Técnicas de espacio de cabeza dinámico (DHS) y “purge and trap”

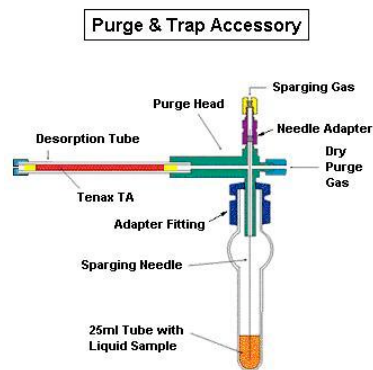


Figura 16: Esquema de muestreo mediante *purge and trap*

Esta técnica se basa en el movimiento de analitos desde la matriz del alimento hacia el espacio de cabeza. La atmósfera que rodea al alimento es atravesada de forma continua por una corriente de gas portador que arrastra con él a los componentes volátiles presentes en el espacio de cabeza (Fig. 16), facilitando la salida de estos desde la muestra hacia el mismo, sin necesidad de esperar a que se alcance el equilibrio químico entre las fases que conforman el sistema. Cuando una muestra líquida es burbujeadada con el gas la técnica se llama “purge and trap”. El análisis se completa con el paso del gas portador a través de una serie de trampas sólidas, donde los analitos quedan adsorbidos, o atrapados mediante la reducción de la temperatura, reteniendo los componentes volátiles y dejando pasar el gas portador. El incremento de la sensibilidad es notable con respecto a SHS. Overton & Manura (1995) compararon ambas técnicas en la determinación de volátiles en aceites de oliva y cocinados y encontraron que DHS resultó hasta 100 veces más sensible. Esta técnica ha sido la más utilizada para la determinación de volátiles en productos derivados del pescado (Alasalvar, Taylor & Shahidi, 2005, Hallier, Prost & Serot, 2005, Hartvigsen, Lund, Hansen & Holmer, 2000, Kulås, Olsen & Ackman, 2002, Nordvi, 2007, Refsgaard, Haahr & Jensen, 1999, Santos, Da Cunha Veloso, De Paula & De Andrade, 2001)

Existen diversas modificaciones en la utilización de esta metodología. Entre los distintos adsorbentes utilizados destaca el Tenax TA o el carbon activo (Morales & Aparicio, 1993). También se pueden utilizar distintos modos de desorción de los analitos como la desorción térmica, que se presume como la más efectiva (Pillonel, Bosset & Tabacchi, 2002), o la elución con disolventes como éter etílico o CS₂. Entre las desventajas de DHS destaca que el tiempo de extracción nunca es menor de 1 o 2 horas, por lo que no se puede considerar como una técnica rápida además de ser compleja, cara y no apta para el análisis rutinario.

4.2.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico (De Fátima Alpendurada, 2000). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la Fig. 17.

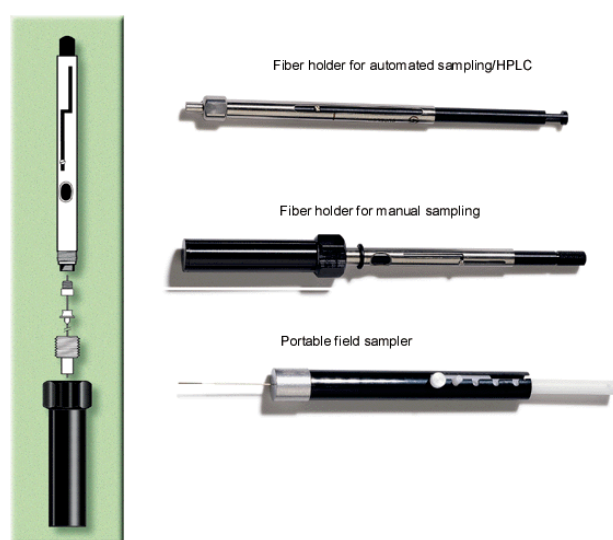


Figura 17: Dispositivos comerciales de SPME para distintos modos de muestreo

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración mencionadas anteriormente ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente, al igual que SHS o DHS, no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen unos límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos (De Fátima Alpendurada, 2000).

a. Proceso de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza de las muestras (HS-SPME)

En el análisis de componentes volátiles mediante SPME, la muestra se introduce en el interior de un vial herméticamente cerrado mediante un septum. La fibra ha de limpiarse antes de efectuar cualquier análisis puesto que la fase polimérica adsorbe compuestos presentes en el aire que pueden producir ruidos de fondo en el análisis cromatográfico. La limpieza se realiza en poco tiempo introduciendo la fibra en un sistema de inyección auxiliar o en un sistema de limpieza para jeringuillas. La SPME consta de 2 etapas básicas en su modalidad más sencilla: extracción y desorción (Fig. 18).

En la etapa de extracción la fibra se expone a la muestra (gas, líquida o sólida) durante un determinado tiempo durante el que los analitos son adsorbidos/absorbidos en la fibra. En la extracción directa la fibra se introduce directamente en la muestra, normalmente líquida, y los analitos son transportados a la fase extractante. En la extracción mediante espacio de cabeza (HS-SPME), los analitos han de ser transportados desde la muestra al espacio de cabeza antes de ser extraídos por la fibra. Por lo tanto, este tipo de muestreo está indicado para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles (con baja solubilidad en la muestra) tanto en matrices sólidas como en líquidas. El modo de extracción HS-SPME también permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles por lo que está especialmente indicada para muestras de tipo biológico donde la interferencia de la matriz es importante.

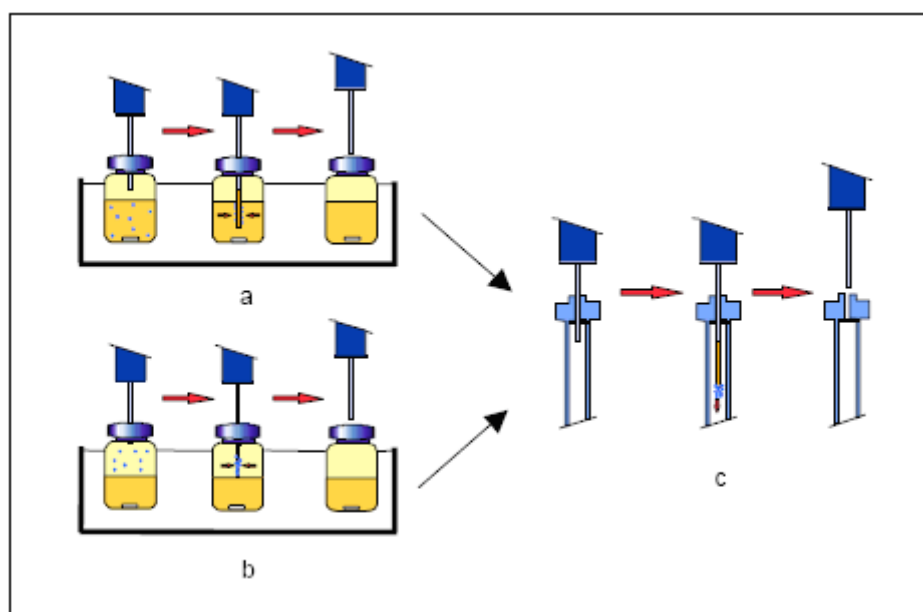


Figura 18: Metodología utilizada SPME acoplada y análisis mediante GC: a) Extracción directa, b) Extracción del espacio de cabeza y c) Desorción térmica.

En la etapa de desorción, los analitos son transferidos al equipo de medida. Puede llevarse a cabo térmicamente (Fig. 18) o bien mediante la utilización de un disolvente orgánico. La utilización de una y otra variantes va a ser dependiente de la técnica analítica utilizada a posteriori. Así, en el caso de tratarse de un cromatógrafo de gases (Fig. 18), la fibra se introduce durante un tiempo en el inyector del sistema cromatográfico a elevada temperatura. De este modo los analitos son desorbidos de la fibra e introducidos directamente en el instrumento de medida. Cuando la técnica es cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE), la desorción se lleva a cabo utilizando un disolvente adecuado que además debe ser compatible con la fase móvil en HPLC o con la disolución tampón empleada en CE.

b. Parámetros experimentales que afectan a la eficacia de la SPME

Existen numerosos factores que pueden influir en la eficacia de la extracción y que deben tenerse en cuenta a la hora de diseñar un método de análisis mediante SPME. A continuación se señalan algunos de los más importantes.

El parámetro más importante es quizás el **recubrimiento de la fibra**. Sus propiedades físicas y químicas son cruciales para el proceso de extracción. La naturaleza del analito determina el tipo de fase que debe utilizarse ya que debe tener gran afinidad por el mismo. El volumen del recubrimiento afecta a la capacidad de la fibra y al volumen de analito que es capaz de extraer. Por lo tanto un incremento en el volumen de la fase podría aumentar la sensibilidad del método, aunque

la cinética de extracción es también más lenta lo que se traduce en un aumento del tiempo de análisis. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un conjunto muy amplio de aplicaciones.

La **temperatura de extracción** afecta tanto a la cinética de extracción como a la termodinámica y selectividad del proceso. En lo que respecta al análisis de compuestos volátiles, un aumento de la temperatura conlleva un coeficiente de reparto mayor en el equilibrio matriz/espacio de cabeza, favoreciendo de esta forma el proceso de extracción. No obstante, temperaturas elevadas pueden afectar al coeficiente de reparto del sucesivo equilibrio entre el espacio de cabeza y la superficie de la fibra; en base a esto se habla de un óptimo de temperatura, dependiente de las interacciones entre analitos, fibra y matriz (Penton, 1996).

El **tiempo de extracción** es un parámetro que afecta de manera importante a la sensibilidad del análisis. Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio. El tiempo de equilibrio es característico de cada sistema analito-fibra y se debe intentar trabajar en esas condiciones para conseguir la eficacia máxima de la extracción ya que, a partir de ese punto, no se puede extraer más cantidad de analito. Existen diversos parámetros, como la **agitación** de las muestras, que favorecen la difusión de los analitos, y que contribuyen a rebajar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio y por lo tanto el tiempo de extracción.

El **volumen de muestra** está directamente relacionado con la sensibilidad del método, ya que a mayor cantidad de muestra, mayor cantidad de analito extraíble. Por otro lado, en HS-SPME, el volumen del espacio de cabeza también afecta a la eficacia de la extracción (Górecki & Pawliszyn, 1997). La eficacia será mayor cuanto más concentrados estén los analitos en el espacio de cabeza ya que se incrementa la velocidad de difusión en la fibra. Por lo tanto, en general, un incremento en la cantidad de muestra aumentará la eficacia de extracción ya que disminuirá el volumen de espacio de cabeza. Sin embargo, una excesiva concentración de volátiles en el espacio de cabeza de la muestra puede dar lugar a la formación de interacciones competitivas por los lugares activos de la superficie de la fibra, desembocando en una reducción de la eficacia (Kanavouras, Kiritsakis & Hernandez, 2005).

La **fuerza iónica** de la muestra, especialmente en muestras acuosas, influye en la eficacia de la SPME. En general, un incremento de este parámetro, mediante la adición de sales como NaCl, KCl o Na₂SO₄, puede aumentar la cantidad de analito extraída, ya que disminuye su solubilidad en la muestra. Un aumento excesivo de la concentración de estas sales puede llevar a interacciones

(especialmente analitos polares) con la forma iónica de la sal, aumentando su solubilidad en la muestra y disminuyendo la eficacia de la extracción.

c. Aplicaciones

La SPME ha sido utilizada para la determinación de compuestos volátiles en diversos productos derivados de la pesca como salsas de pescado (Pham, Schilling, Yoon, Kamadia & Marshall, 2008) o aceite de pescado microencapsulado (Jónsdóttir, Bragadóttir & Arnarson, 2005). En numerosas ocasiones se ha utilizado para la determinación de los compuestos volátiles relacionados con el aroma de distintas especies de pescado fresco o sometidas a algún tipo de procesado como pescadilla (Duflos, Moine, Coin & Malle, 2005), pez espada (Guillén, Errecalde, Salmerón & Casas, 2006), bacalao (Guillén, Errecalde, Salmerón & Casas, 2006), dorada (Guillén & Errecalde, 2002), trucha (Guillén & Errecalde, 2002) o atún (Edirisinghe, Graffham & Taylor, 2007). La monitorización de aminas como marcadores de frescura, mediante SPME, ha sido utilizada en numerosos trabajos (Béné, Hayman, Reynard, Luisier & Villettaz, 2001, Chan, Yao, Wong, Wong, Mok & Sin, 2006), aunque se han utilizado otros volátiles para evaluar este parámetro (Duflos, Coin, Cornu, Antinelli & Malle, 2006, El Barbri, Amari, Vinaixa, Bouchikhi, Correig & Llobet, 2007, Triqui & Bouchriti, 2003, Triqui, 2006, Wierda, Fletcher, Xu & Dufour, 2006). En la literatura no se encuentran muchos trabajos que utilicen SPME para la búsqueda o determinación de compuestos volátiles marcadores de la oxidación lipídica. Jónsdóttir, Bragadóttir & Olafsdottir (2007) utilizaron el análisis de hexanal, Z-4-heptenal and 2,4-heptadienal para monitorizar la oxidación inducida por Hb en músculo lavado de bacalao. Iglesias, Medina, Bianchi, Careri & Mangia (2009) utilizaron la SPME para evaluar las diferencias en la composición volátil de dorada de acuicultura procedente de Italia y de España. Por último, Chopin, Kone & Serot (2007) utilizaron la SPME para determinar la influencia de diferentes aldehídos procedentes de la oxidación lipídica en las propiedades estructurales de músculo de bacalao mediante el estudio de sus interacciones con la miosina.

4.2.2. Técnicas de análisis e identificación

La introducción a principios de la década de los cincuenta de la **GC** supuso un gran avance en el análisis de componentes volátiles y se ha convertido, sin duda, en la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos en las distintas muestras de alimentos. La combinación con detectores adecuados, permite desvelar gran cantidad de información acerca de la composición volátil de un alimento derivado de la pesca. Sin duda, la **espectrometría de masas (MS)**, que ofrece de forma simultánea información cualitativa y cuantitativa de la composición

volátil, es la técnica de detección más completa y utilizada para el análisis de compuestos volátiles en alimentos. El analito, a la salida de una columna cromatográfica, es primeramente ionizado con la finalidad de obtener una nube de fragmentos de iones con una distribución de relaciones masa/carga (m/z). Mediante la separación de estos fragmentos iónicos en base a su relación m/z y la medida de las intensidades de las señales se obtiene un espectro de masas que define las características del compuesto. Otros detectores como el de **ionización de llama (FID)** han sido utilizados para la cuantificación de compuestos volátiles (Jónsdóttir, Bragadóttir & Arnarson, 2005, Prost, Hallier, Cardinal, Serot & Courcoux, 2004) debido a que muestra una aceptable sensibilidad y bajo coste, pero presenta la limitación de la imposibilidad de la detección cualitativa de los analitos. La **GC-olfatometría** se utiliza para la determinación de los compuestos volátiles que tienen influencia en el aroma de la matriz. Cada uno de los compuestos separados mediante GC son evaluados sensorialmente a la salida de la columna para determinar su impacto aromático individual. Por tanto la detección de compuestos es dependiente del umbral de detección sensorial y no da información de tipo cualitativo. Para paliar estas limitaciones se han desarrollado las técnicas en las que el análisis cromatográfico se lleva a cabo con la utilización de un divisor de flujo a la salida de la columna, de tal forma que las muestras son analizadas simultáneamente mediante un detector FID o MS y un detector olfatométrico (Triqui & Bouchriti, 2003, Triqui, 2006).

La **nariz electrónica** es una técnica inspirada en el sistema olfativo, es decir, que tiene un sistema de aspiración de olores pero en lugar de células olfativas que detectan la presencia de olores, tiene sensores. Así como el cerebro registra la huella digital de una fragancia, la nariz electrónica usa métodos matemáticos permitiendo reconocer los patrones de un olor. La técnica generalmente aporta una información comparativa más que cualitativa y cuantitativa. Esta técnica ha sido utilizada para la determinación de frescura en músculo de pescado (Barat, Gil, García-Breijo, Aristoy, Toldrá, Martínez-Mañez & Soto, 2008, El Barbri, Llobet, El Bari, Correig & Bouchikhi, 2008) y para la determinación de la oxidación lipídica en muestras de arenque (Haugen & Undeland, 2003).

Por último, la **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)** ha sido escasamente utilizada para la determinación de compuestos volátiles en muestras de pescado debido a las desventajas que presenta con respecto a la GC. Da Cunha Veloso, Da Silva, Santos & De Andrade (2001) determinaron aldehídos volátiles relacionados con la oxidación lipídica, como propanal, pentanal o hexanal, en muestras de pescado. Para ello realizaron una extracción y derivatización simultánea (con 2,4-dinitrofenilhidrazina) mediante DHS utilizando HPLC acoplado a un detector ultravioleta (UV) como técnica de separación e identificación.

5. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y RETARDO DE LA OXIDACIÓN. ADICIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.

El diseño de estrategias de control de la oxidación lipídica es un aspecto muy importante desde el punto de vista comercial y de calidad organoléptica, al ralentizar el deterioro del alimento durante las distintas etapas de almacenamiento y/o procesado del producto. A día de hoy, todavía no es posible la completa eliminación de la rancidez en el pescado pero existen diversas estrategias, relacionadas con el mecanismo de oxidación, que retardan, en la medida de lo posible este proceso. Estas estrategias pueden resumirse en 6 puntos de acuerdo con Frankel (1998):

1.- La inactivación de metales u otras sustancias prooxidantes mediante la utilización de agentes quelatantes como AEDT, ácido cítrico o ácido tartárico

2.- La eliminación de Hb por sangrado o la eliminación del músculo rojo que presenta una mayor inestabilidad oxidativa que el músculo blanco.

3.- Estrategias de procesamiento como el enlatado o las atmósferas modificadas que reduzcan la exposición a la luz, el aire, la humedad y la pérdida de antioxidantes naturales.

4.- La reducción de la temperatura de almacenamiento, siendo ésta la estrategia más utilizada para retardar el proceso de deterioro lipídico. Son necesarias temperaturas de hasta -30 o -40 °C para incrementar significativamente el tiempo de almacenamiento de la mayoría de las especies de pescado (Ke, Ackman, Linke & Nash, 1977) y se ha comprobado que la tasa de reacción de oxígeno con grasas se duplica por cada 10 °C de incremento en la temperatura (Pokorny & Yanishlieva, 2005).

5.- El pH del músculo es un parámetro crítico. La reducción del mismo tras la muerte del pescado es en parte responsable de la liberación de enzimas autolíticas que interfieren en la hidrólisis de acilglicéridos y del incremento de la actividad prooxidante de las distintas hemoproteínas presentes en el músculo de pescado.

6.- Utilización de aditivos antioxidantes.

El tiempo de vida de los alimentos derivados del pescado, tras la aplicación de estos tratamientos, puede incrementarse considerablemente dependiendo de la estrategia a seguir pero ninguno es completamente efectivo. En casos extremos el tiempo de vida del alimento es tan extenso que parece que el proceso de oxidación lipídica ha sido totalmente eliminado como es el caso de la combinación tratamiento térmico/enlatado. Desgraciadamente no todos los tratamientos son aplicables en todos los casos, por lo que es razonable pensar en la utilización de combinaciones

de varios para aumentar el tiempo de vida del alimento. Así, por ejemplo, es habitual el almacenamiento de músculo de pescado congelado o en atmósferas inertes tras la adición de sustancias antioxidantes.

5.1. Control de la oxidación lipídica mediante la adición de sustancias antioxidantes

Se han llevado a cabo considerables esfuerzos para diseñar estrategias que retarden la aparición de la rancidez oxidativa y una de las más importantes es la utilización de aditivos antioxidantes. Según Halliwell & Gutteridge (1990) una sustancia antioxidante es “aquella que, cuando está presente a bajas concentraciones en comparación con el sustrato susceptible a la oxidación sobre el que actúa, produce un retardo significativo o previene la oxidación de ese sustrato”. Los antioxidantes son moléculas de tipo orgánico, de origen sintético o natural, que pueden actuar mediante diversos mecanismos inhibiendo el progreso de la oxidación lipídica en cualquiera de las distintas etapas que constituyen esta reacción (Fig. 19) o interactuando con los distintos antioxidantes endógenos impidiendo su consumo durante el desarrollo de la oxidación (Fig. 19). Según su mecanismo de actuación, podrían dividirse en 7 tipos:

- 1) Inhibidores de las reacciones que implican la formación de radicales libres: Son los llamados “antioxidantes preventivos”. Entre los más importantes destacan los que son capaces de evitar la descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa de iniciación.
- 2) Antioxidantes que inhiben o interrumpen el mecanismo de autooxidación en la etapa de propagación, también llamados “verdaderos antioxidantes”.
- 3) Sustancias que inhiben la activación de la oxidación lipídica promovida por la luz desactivando moléculas excitadas como el oxígeno singlete. Son las llamadas “quencher” y normalmente son del grupo de los carotenos.
- 4) Sustancias que actúan de forma sinérgica con los “verdaderos antioxidantes”. Pueden ser sustancias que no poseen gran actividad antioxidante por sí solas pero que potencian la actividad de otros antioxidantes, tanto aditivos como endógenos. El ejemplo más claro de este tipo de compuestos es el ácido cítrico.
- 5) Agentes reductores como los tioles, que son capaces de convertir hidropéroxidos lipídicos en compuestos más estables mediante un mecanismo no radicalario.

- 6) Los agentes quelatantes convierten los metales prooxidantes como el Fe o el Cu en productos estables evitando el efecto catalítico de los mismos. La quercetina y los taninos son ejemplos de agentes quelatantes eficientes.
- 7) Inhibidores de enzimas prooxidantes como las lipoxigenasas.

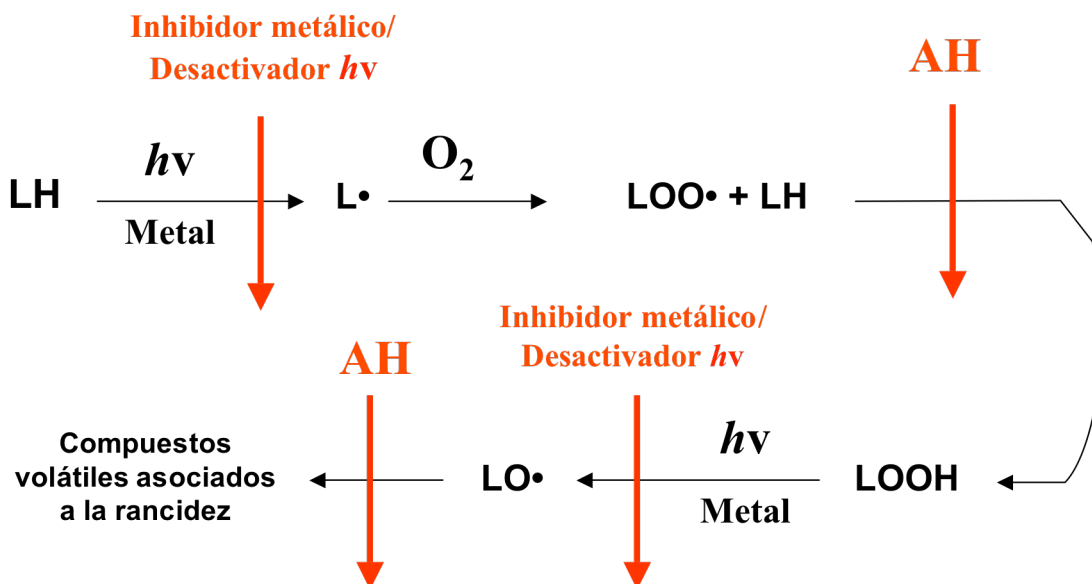


Figura 19: Lugares de actuación de los aditivos antioxidantes en el mecanismo de la oxidación lipídica.

No todas las sustancias con capacidad antioxidante desde el punto de vista químico pueden utilizarse como aditivos antioxidantes en un alimento como pueden ser los productos derivados de la pesca, ya que, además de su actividad para inhibir el deterioro oxidativo, deben cumplir una serie de requisitos relacionados con aspectos económicos y de la salud, entre los que destacan:

- 1) Deben ser inocuos. Los efectos de un aditivo alimentario sobre la salud deben ser el primer parámetro a tener en cuenta a la hora de elegir su utilización. El uso de antioxidantes sintéticos y sus niveles en alimentos está sujeto a normativas españolas y europeas. A modo de ejemplo, la dosis máxima recomendada para el butilhidroxianisol (BHA) y el propilgalato (PG) es de 200 mg/Kg de grasa, y para el butilhidroxitolueno (BHT) es de 100 mg/Kg de grasa (Madrid & Madrid, 2000). En este sentido, la legislación sobre antioxidantes naturales no permite la utilización de compuestos puros, pero sí de extractos que contengan esos componentes.

- 2) No deben modificar organolépticamente el alimento. Cambios en el olor, sabor o color pueden generar el rechazo del producto por parte del consumidor.
- 3) Deben ser efectivos a bajas concentraciones ya que a mayores concentraciones se incrementa el riesgo de toxicidad, o aumenta el riesgo de modificaciones de tipo organoléptico en el alimento.
- 4) La incorporación de un antioxidante al producto que se adiciona es un aspecto muy importante desde el punto de vista de su eficacia. La actividad no depende exclusivamente de las propiedades químicas del mismo sino también de la accesibilidad o difusión hacia los puntos sensibles a la oxidación del alimento o producto de la pesca. La solubilidad del antioxidante debe ser compatible con el estado físico del sustrato lipídico sobre el que va a actuar y por tanto, los coeficientes de partición son un parámetro a tener en cuenta a la hora de elegir una u otra sustancia como aditivo antioxidante. La llamada “paradoja polar” (Frankel, 1998) predice que los antioxidantes hidrofílicos son más efectivos en sistemas apolares como los aceites ya que se sitúan en la interfase aceite/aire, donde se produce un mayor contacto con el oxígeno. En cambio, en los sistemas bifásicos aceite/agua, como las emulsiones, los antioxidantes lipofílicos son más eficaces que los hidrofílicos pues se concentran en las interfases aceite/agua, donde tiene lugar la interacción entre las sustancias antioxidantes (iones metálicos, Hb, H₂O₂,...) y el sustrato lipídico, mientras que los hidrofílicos se sitúan a lo largo de la fase acuosa. Sin embargo, ciertos antioxidantes no muestran el comportamiento predicho por esta hipótesis (Decker, Warner, Richards & Shahidi, 2005), lo que prueba que éste no es el único factor que influye en la actividad de una sustancia antioxidante.
- 5) Deben ser térmicamente estables frente a los distintos métodos de procesamiento ya que a menudo son aplicados a productos que posteriormente son sometidos a métodos que implican la utilización de altas temperaturas.
- 6) El coste del antioxidante y su aplicación no debe encarecer significativamente el precio del producto sobre el que se adiciona.

La utilización de la combinación de varias sustancias antioxidantes puede dar lugar a lo que se denomina efecto sinérgico. Esto es, la aplicación de dos o más antioxidantes produce una efectividad mayor que la suma de efectividades de ambos compuestos actuando individualmente.

Diversas sustancias utilizadas como aditivos antioxidantes en alimentos, pueden tener, en ciertas condiciones, actividad prooxidante. Se ha comprobado que los flavonoides pueden actuar

como prooxidantes (Cao, Sofic & Prior, 1997) en presencia de Cu^{2+} , o que pueden reducir el hierro férrico a hierro ferroso, su forma más prooxidante. Antioxidantes como quercetina, miricetina y kamferol, pueden inducir la lipoperoxidación y daños en el ADN en presencia de metales de transición. Como se ha indicado anteriormente, el ácido ascórbico puede mostrar actividad prooxidante dependiendo de su concentración o en presencia de metales de transición. Por último, Burton & Ingold (1984) mostraron que el β -caroteno, a presiones altas de oxígeno, pierde actividad antioxidante e incluso puede funcionar como catalizador de reacciones de oxidación. Por lo tanto, es muy importante conocer las condiciones en que una sustancia puede funcionar como anti- o prooxidante antes su aplicación como aditivo.

5.1.1. Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos más importantes o más utilizados como aditivos en alimentos son el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), el propilgalato (PG) y el palmitato de ascorbilo. Otros como la terbutilhidroquinona (TBHQ) pueden utilizarse en Estados Unidos pero no en Europa. Las estructuras de estos antioxidantes se muestran en la Fig 20.

Los antioxidantes sintéticos son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos. BHA y BHT son muy efectivos en grasas animales y menos en las grasas y aceites vegetales. Se ha demostrado que estos dos compuestos son sinérgicos entre si de la misma forma que BHA es sinérgico con PG. TBHQ, debido a su estabilidad térmica, es considerado el más eficaz y aconsejable en alimentos sometidos a tratamientos que conlleven incrementos importantes de temperatura. El palmitato de ascorbilo es referido a menudo como un antioxidante natural pero estrictamente hablando no es correcto definirlo de esta forma ya que es el ácido ascórbico el que se encuentra verdaderamente en la naturaleza y no el éster. La finalidad de la síntesis de este compuesto es simplemente el aumentar la liposolubilidad del ácido ascórbico y facilitar su acceso a los sitios activos de la oxidación lipídica. Normalmente se administra en combinación con otros antioxidantes como los tocoferoles.

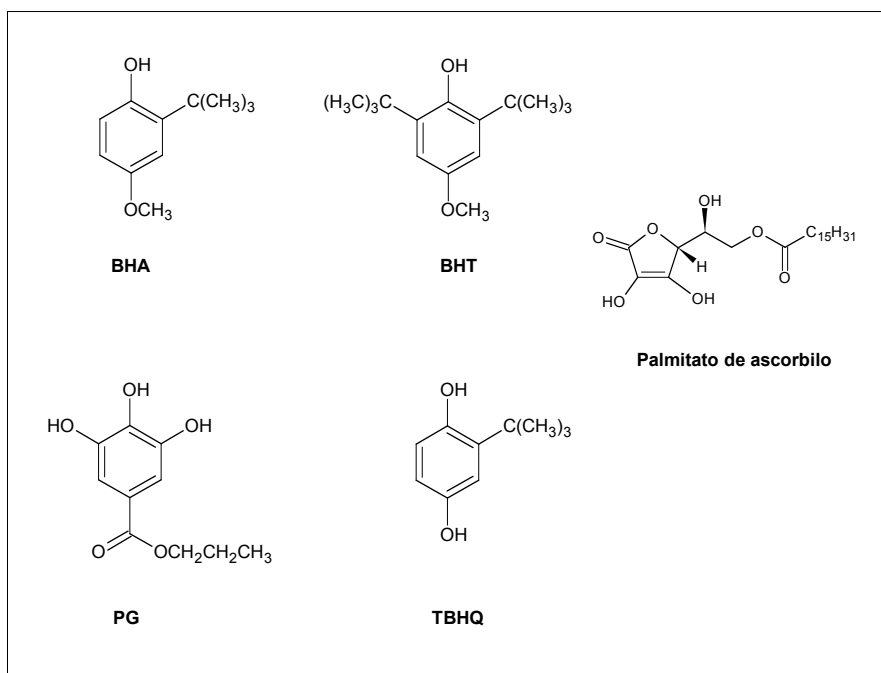


Figura 20: Estructuras químicas de los antioxidantes sintéticos más comunes utilizados en alimentos

Si bien los antioxidantes sintéticos son altamente efectivos y económicos, durante los últimos años su empleo está siendo cuestionado por sus posibles efectos adversos sobre la salud. Existen estudios que demuestran los efectos carcinogénicos de estas sustancias en animales (Botterweck, Verhagen, Goldbohm, Kleinjans & Van den Brandt, 2000). El BHT es tóxico en proporciones mayores a las permitidas y ha sido prohibido en el Reino Unido, Japón, Rumania, Australia mientras que Estados Unidos prohibió su uso en alimentos infantiles. TBHQ no está permitida en Canadá y en la Comunidad Europea. Por ello, actualmente, múltiples investigaciones están siendo dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad antioxidante que permitan sustituir a los sintéticos, o combinarlos de manera que se pueda reducir la concentración de estos últimos en los alimentos.

5.1.2. Antioxidantes naturales

Es muy difícil proporcionar una definición exacta de antioxidante natural pero, en general, el término alude a aquellas sustancias, con propiedades antioxidantes, que se presentan o pueden ser extraídas de los tejidos de las plantas y los animales (Pokorny & Yanishlieva, 2005). Debido a la mala imagen adquirida y al rechazo por parte del consumidor de los antioxidantes sintéticos, la utilización de antioxidantes naturales como aditivos alimentarios ha adquirido un gran interés en los últimos

años. Este tipo de sustancias presenta una serie de ventajas con respecto a la utilización de sus homólogos sintéticos: en primer lugar, no existe una legislación restrictiva en caso de que el aditivo sea un extracto y no un compuesto puro, son aceptados tanto por las autoridades sanitarias como por los consumidores y, en ciertos casos, pueden ser utilizados como colorantes o para impartir ciertos olores o sabores a los alimentos sobre los que son aplicados. Sus mayores inconvenientes son la presencia de otras sustancias no deseadas presentes en los extractos utilizados, el desconocimiento real de los riesgos que comportan sobre la salud o los caracteres organolépticos no deseados que pueden aportar a los alimentos. La mayoría de los compuestos son fenólicos, entre los cuales, los principales son los tocoferoles, los flavonoides, y los ácidos fenólicos. El ácido ascórbico y los tocoferoles son los antioxidantes naturales más empleados comercialmente. Los carotenoides, los aminoácidos y ciertas proteínas son otros constituyentes del reino vegetal y animal, con potencial actividad antioxidante.

5.1.2.1. Tocoferoles

Los tocoferoles y tocotrienoles son el grupo de sustancias antioxidantes mejor conocidas y más ampliamente utilizadas. Cada una de estas familias está formada por hasta cuatro isómeros (α -, β -, γ -, δ -) (Fig. 21) con distintas capacidades para donar hidrógenos, que siguen el orden δ - > β - = γ - > α -.

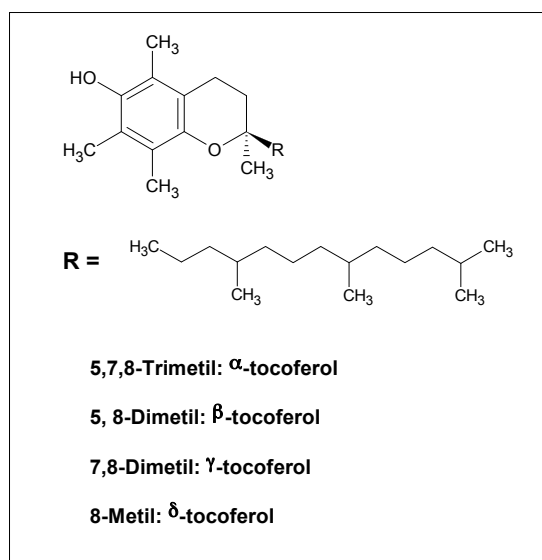


Figura 21: Estructura química de los distintos isómeros del tocoferol.

Hamilton, Kalu, McNeill, Padley & Pierce (1998) estudiaron los efectos de concentrados de α -, γ -/ β -, y δ - tocoferol aislados y combinados con palmitato de ascorbilo y lecitina para retardar la oxidación lipídica en aceite de pescado almacenado a 20 °C. El orden de capacidad antioxidante fue δ - > γ -/ β - > α - especialmente a niveles de concentración altos. La capacidad antioxidante de los tocoferoles es fuertemente dependiente de la concentración: a concentraciones bajas ($\leq 50 \mu\text{g/g}$) el α -tocopherol es más efectivo que el γ -tocopherol pero a concentraciones altas ($>100 \mu\text{g/g}$) es más efectivo el segundo (Lampi, Kataja, Kamal-Eldin & Vieno, 1999). En los alimentos, los tocoferoles actúan como antioxidantes relativamente débiles y su eficacia es mayor en sistemas emulsionados de aceite en agua que en un sistema monofásico debido a su carácter lipofílico y a la denominada “paradoja polar”. La administración de la forma hidrofílica de este antioxidante, el α -tocopherol acetato, en la dieta de diversos animales de granja mejoró la estabilidad de sus carnes (Tang, Sheehan, Buckley, Morrissey & Kerry, 2001). En trucha, el incremento de los niveles en la dieta no mostró ningún efecto antioxidante sobre el músculo blanco, observándose una pequeña reducción de la oxidación lipídica en el músculo rojo (Pozo, Lavety & Love, 1988). Se ha demostrado que la administración del α -tocopherol en la dieta es más eficaz como antioxidante que la aplicación directa sobre el músculo del pescado (He & Shahidi, 1997) debido a que *in vivo* el α -tocopherol se concentra en las membranas, muy susceptibles a la oxidación lipídica, mientras la distribución tras la adición *post mortem* es mucho menos eficaz.

5.1.2.2. Ácido ascórbico

La aplicación del ácido ascórbico como único suplemento antioxidante no suele ser muy efectiva para la inhibición de la oxidación y habitualmente es empleado en presencia de tocoferol debido al gran sinergismo que genera este sistema antioxidante binario (Vicetti, Ishitani, Salas & Ayala, 2005). Como se ha mencionado anteriormente, el ácido ascórbico actúa como un eficaz agente reductor regenerando tocoferol a partir del radical tocoferilo.

5.1.2.3. Fenoles y ácidos fenólicos simples

Se caracterizan por la presencia de un esqueleto fenólico, que se compone de un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Los más abundantes en la naturaleza son los derivados del ácido benzoico y el ácido cinámico (Fig. 22). Se encuentran en vegetales y la mayor parte de las veces conjugados como ésteres o glicósidos. Su actividad antioxidante se debe fundamentalmente a la capacidad de donación de hidrógenos y de captación de radicales libres debido al hidrógeno

fenólico. Entre los fenoles simples destacan el p-cresol, que se encuentra en diversas frutas, el 3-etilfenol o el 3,4-dimetilfenol. Los ácidos fenólicos se dividen en tres grupos (Soares, 2002). En primer lugar los derivados del ácido benzoico, que poseen 7 átomos de carbono (C_6-C_1) y son los más simples que se encuentran en la naturaleza. El segundo grupo está formado por los ácidos cinámicos que poseen 9 átomos de carbono (C_6-C_3). Por último están las cumarinas, que son compuestos derivados del ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido o-cumárico. Prácticamente todas las cumarinas poseen un sustituyente hidroxílico en posición 7 ya sea libre o combinado con grupos metilo, azúcares, u otros grupos funcionales.

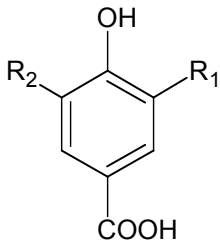
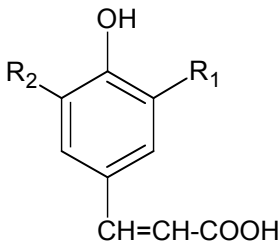
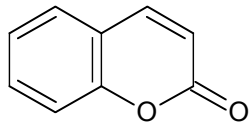
Derivados del ácido benzoico			Derivados del ácido Cinámico			Cumarinas		
								
Compuesto	R ₁	R ₂	Compuesto	R ₁	R ₂			
Ácido p-Hidroxibenzoico	H	H	Ácido p-Cumárico	H	H			
Ácido Vanílico	H	OCH ₃	Ácido Ferúlico	H	OCH ₃			
Ácido Siringico	OCH ₃	OCH ₃	Ácido Sinápico	OCH ₃	OCH ₃			
Ácido Dihidroxibenzoico	OH	H	Ácido Cafeico	OH	H			
Ácido Gálico	OH	OH						

Figura 22: Estructuras de los ácidos fenólicos simples más importantes

Los derivados del ácido cinámico son los más utilizados como antioxidantes y son en su mayoría derivados de los ácidos p-cumárico, ferúlico y cafeico (Fig. 22) mientras que la utilización del ácido sinápico es menos habitual. Además de presentarse en su forma natural, habitualmente se encuentran en la naturaleza esterificados o glicosilados. El ejemplo más importante de este tipo de combinaciones es, probablemente el ácido clorogénico, cuya estructura deriva del ácido cafeico esterificado con el ácido quínico (Fig. 23).

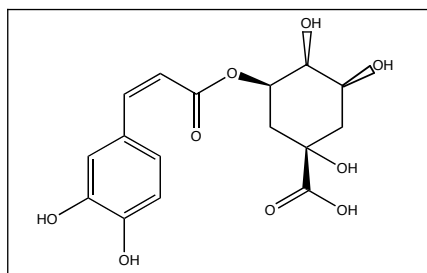


Figura 23: Estructura del ácido clorogénico.

5.1.2.4. Flavonoides

Los flavonoides son una familia de compuestos antioxidantes de tipo fenólico ampliamente distribuidos en la naturaleza, de los que se han detectado aproximadamente unas 4000 estructuras diferentes (Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002). Se encuentran en frutas, verduras, frutos secos, semillas, cereales, así como en la cerveza, el té o el vino. Se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, a excepción de los tubérculos de la cebolla que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras & Tunón, 2002). Su esqueleto básico está formado por estructuras del tipo C₆-C₃-C₆. La más básica consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos, los cuales normalmente condensan para formar un anillo pirano y menos comúnmente un anillo furano (Xing & White, 1997) (Fig. 24).

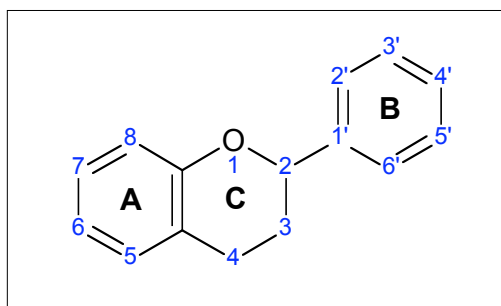


Figura 24: : Esqueleto estructural de los flavonoides.

El anillo aromático que cicla con el grupo C₃ para formar el anillo pirano se denomina anillo A, el ciclo pirano es el anillo C y mientras que el anillo restante se denomina anillo B. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B del 2' al 6'. Esta estructura básica permite una multitud de patrones y variaciones en el anillo C. Los distintos grupos hidroxilo son añadidos, metilados, sulfatados o glicosilados en procesos metabólicos en las plantas.

Introducción

En los alimentos anteriormente mencionados existen principalmente como 3-*O*-glucósidos y polímeros. Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales. Dentro del grupo de los flavonoides propiamente dicho, los más destacables son las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas y antocianidinas (Fig. 25).

Flavonas			Isoflavonas				Flavonoles				
Compuesto	3'	4'	Compuesto	4'	5	7	Compuesto	2'	3'	4'	5'
Apigenina	H	OH	Genisteína	OH	OH	OH	Quercetina	H	OH	OH	H
Luteonina	OH	OH	Genistina	OH	OH	O-Glucosa	Miricetina	H	OH	OH	OH
							Morina	OH	H	OH	H
							Kaemferol	H	H	OH	H
							Rutina*	H	OH	OH	H
							Hesperidina**	H	OH	OCH ₃	H
							* Glucósido de O-Rutinoso en C3				
							** Glucósido de O-Rutinoso en C7				

Flavonoles				Flavanonas				Antocianidinas						
Compuesto	3'	4'	5'	Compuesto	3	3'	4'	Compuesto	3	3'	4'	5'	5	7
Catequina	OH	OH	H	Naringenina	H	H	OH	Apigeninidina	H	H	OH	H	OH	OH
Catequin-3-galato*	OH	OH	H	Naringina*	O-Ra	H	OH	Cianidina	OH	OH	OH	H	OH	OH
Galocatequina	OH	OH	OH	Taxifolina	OH	OH	OH	Malvidina	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH
Galocatequin-3-galato*	OH	OH	OH											
*Ácido Gálico esterificado en OH de C3				*Glucósido de O-Ramnoglucosa en C3										

Figura 25: Estructuras químicas de algunos de los flavonoides más importantes

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente en la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos habituales de tipo azucarado son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa así como el ácido D-glucurónico. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que sus respectivos flavonoides o agliconas.

Los flavonoides también se pueden encontrar en forma polimérica, estando presentes en muchos de los alimentos que se consumen en los países occidentales, como el té (Balentine, Wiseman & Bouwens, 1997), el vino tinto (Carando, Teissedre, Pascual-Martinez & Cabanis, 1999) o el chocolate (Adamson et al., 1999) o en frutas, legumbres y cereales (Schieber, Keller & Carle, 2001). La gran mayoría forma estructuras conocidas como taninos que son probablemente los polímeros más importantes desde el punto de vista alimentario. Los taninos están compuestos por monómeros unidos mediante enlaces C-C (Fig. 26) y se clasifican en tres grupos: taninos hidrolizables, parcialmente hidrolizables y condensados (Khanbabaei & Van Ree, 2001). Éstos últimos, también llamados proantocianidinas, son oligómeros y polímeros formados por unidades de flavanoles no hidrolizables en condiciones suaves. Las procianidinas son un grupo de taninos que están constituidas por unidades de (+)-catequina y (-)-epicatequina con uniones C4-C6 y C4-C8 (Fig 26).

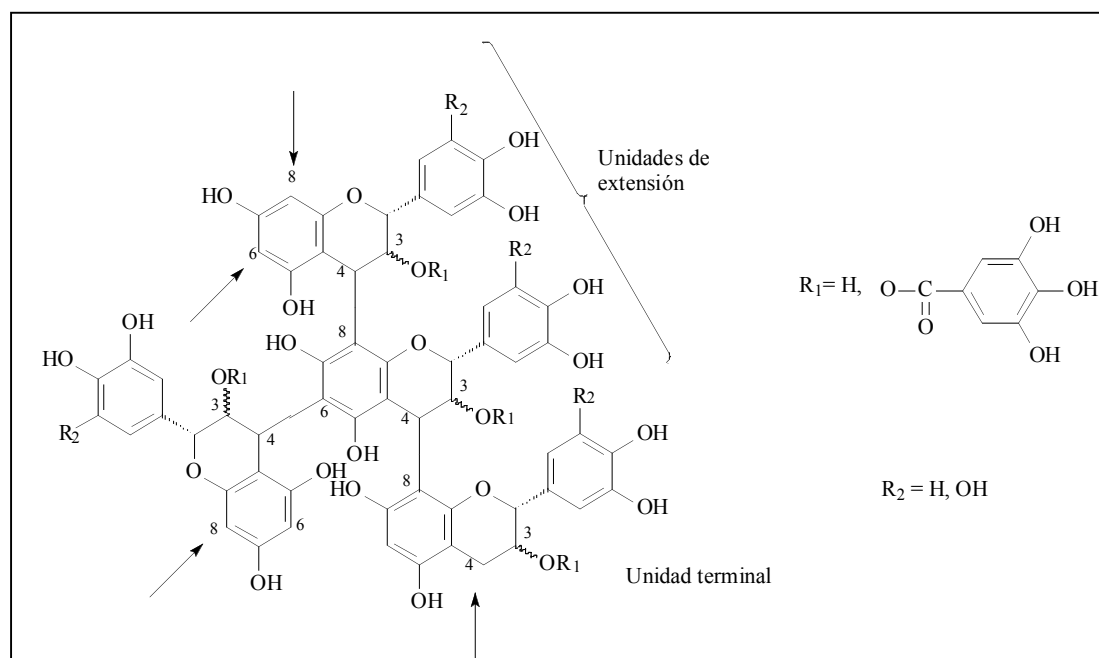


Figura 26: Estructura polimérica de las procianidinas.

Relación entre estructura química y actividad antioxidante de flavonoides.

La estructura fundamental de los flavonoides permite una multitud de patrones de sustitución. Su actividad antioxidante va a depender tanto del tipo de flavonoide como del número de monómeros que conforman su estructura, así como de la presencia de distintas modificaciones o grupos funcionales y de su posición (Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002, Pedlar, Ptashynski, Evans & Klaverkamp, 2002). A continuación se resumen algunos de los parámetros estructurales que afectan a la actividad de estos antioxidantes.

1) Grupos hidroxilo. La presencia y posición de grupos hidroxilo en distintas partes de la molécula va a influir notablemente en los mecanismos de actividad antioxidante. La capacidad de neutralización de radicales libres va a depender fundamentalmente de la reactividad de los sustituyentes hidroxilo. Por ejemplo, los grupos hidroxilo en el anillo B pueden donar fácilmente hidrógenos y electrones a distintos ROS o RNS ya que el radical flavonoide formado está muy estabilizado. Entre los homólogos estructurales flavonas y flavanonas, la capacidad neutralizadora de radicales libres se incrementa de manera lineal y curvilínea respectivamente con el aumento de grupos hidroxilo en su estructura (Cao, Sofic & Prior, 1997). La formación de un grupo catecol (2 grupos -OH en posiciones 3' y 4') en el anillo B aumenta considerablemente la capacidad antioxidante. Así, las flavonas carentes del grupo catecol, o pirogalol (3 grupos -OH en posiciones 3', 4' y 5') forman radicales relativamente inestables y son malos neutralizadores de otros radicales (Burda & Oleszek, 2001). La actividad de un flavonoide está fuertemente influenciada por la presencia de un grupo -OH en posición 3 (anillo C). Burda & Oleszek (2001) han publicado que la alta actividad antioxidante de la quercetina es debida fundamentalmente a la presencia de ese sustituyente. La sustitución del 3-OH por grupos metilo metil o glicosil, reduce considerablemente la actividad de la quercetina y el kamferol en la oxidación de ácido linoleico.

2) Doble enlace en las posiciones 2-3 y el grupo carbonilo en 4. Burda & Oleszek (2001) no encontraron relación entre la insaturación entre los carbonos 2 y 3 y la capacidad antioxidante del flavonoide medida mediante el método DPPH en disolución metabólica. Sin embargo, Cholbi, Paya & Alcaraz (1991) mostraron que la capacidad antioxidante sobre un sistema microsomial se vio incrementada cuando el doble enlace se encontraba conjugado con un grupo carbonilo en la posición 4.

3) Esterificación con grupos no glicosílicos. Es común la esterificación de los flavonoides con diversos ácidos orgánicos. Entre ellos el ácido gálico es el más frecuentemente unido a este tipo

de sustancias, habitualmente en el grupo hidroxilo de la posición 3. Los flavonoides así esterificados se denominan galatos.

4) Esterificación con grupos glicosilo: Las agliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicósidos (Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002). Además de esto, la capacidad antioxidante de un flavonoide glicosilado depende de la estructura y la posición del azúcar. La posición más frecuente para la conjugación es del carbono 3, si se encuentra hidroxilada, o el carbono 7 en caso contrario. La D-glucosa es el azúcar más comúnmente unido a los flavonoides aunque no el único.

5) Grado de polimerización. Los fenoles poliméricos presentan una estructura muchas veces poco entendida y, debido a esta complejidad, no existen reglas perfectamente establecidas que la relacionen con la capacidad antioxidante. Vennart, Bos, Pourrat & Bastide (1994) estudiaron la relación entre el grado de polimerización de las procianidinas y la capacidad antioxidante de las mismas contra el anión superóxido. En general, los dímeros y trímeros resultaron más efectivos que los flavonoides monoméricos contra el anión superóxido. Los tetrámeros mostraron una mayor actividad que los trímeros mientras que los hexámeros y heptámeros mostraron todavía mayor capacidad de neutralización del anión superóxido que trímeros y tetrámeros. Pazos, Gallardo, Torres & Medina (2005) ensayaron la capacidad antioxidante de los distintos monómeros, oligómeros y flavonoles glicosilados procedentes de un extracto de uva, sobre lípidos derivados de productos de la pesca. Los resultados concluyeron que los oligómeros de flavanoles (procianidinas) fueron más efectivos que los monómeros para inhibir la oxidación lipídica en emulsiones de aceite de pescado y en músculo de pescado. Yamaguchi, Yoshimura, Nakazawa & Ariga (1999) midieron la capacidad de distintas procianidinas sintéticas con distinto grado de polimerización en la neutralización del anión superóxido y concluyeron que los pentámeros mostraron la mayor actividad. A continuación los trímeros, tetrámeros y los dímeros. Todas los oligómeros se mostraron más activos que los monómeros (catequina). Los resultados obtenidos tras la revisión de la bibliografía no mostraron, por tanto, la existencia de una relación directa entre el grado de polimerización de los polifenoles y su actividad antioxidante.

5.2. Residuos industriales como fuente de compuestos antioxidantes: Bagazo de uva, corteza de pino y corteza de Hamamelis

Muchos de los vegetales que consumimos en la dieta humana y los residuos que estos generan, son una importante fuente de compuestos antioxidantes. Así, por ejemplo, se han encontrado importantes cantidades de polifenoles en numerosos vegetales como cacao (Jalil & Ismail, 2008) tomate (Vinson, Proch & Bose, 2001), o té (Sajilata, Bajaj & Singhal, 2008) y en distintos tipos de frutas y sus residuos como fresas (Abuja, Murkovic & Pfannhauser, 1998), cerezas (Wang & Sporns, 1999), cítricos (Agócs, Nagy, Szabó, Márk, Ohmacht & Deli, 2007), kiwi (Wu, Gu, Prior & McKay, 2004), aceitunas (Obied, Allen, Bedgood, Prenzler, Robards & Stockmann, 2005) o uvas (Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang & Glover, 1999). Las diferentes partes de ciertos árboles o arbustos también resultan una importante fuente de compuestos fenólicos (Packer, Rimbach & Virgili, 1999).

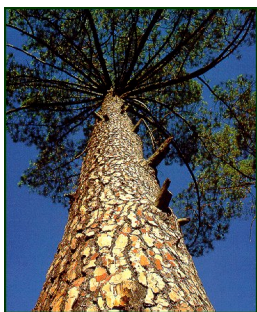
En muchos procesos agroindustriales y forestales, como la elaboración vinos o la producción de madera, se generan subproductos que no se aprovechan suficientemente y en muchos casos su valor es totalmente desconocido. Puesto que las industrias generadoras no encuentran en ellos más que un problema para su disposición final y una complicación desde el punto de vista ambiental, la utilización de este material descartado no solo podría ser económicamente viable sino también ambientalmente favorable. Diferentes tipos de residuos, de origen vegetal, han sido aprovechados y estudiados como fuentes baratas para la extracción de distintos antioxidantes. Rodríguez de Sotillo, Hadley & Holm (1994) utilizaron pieles de patata para la obtención de un extracto fenólico y su aprovechamiento para retardar la oxidación lipídica en aceite de girasol. Se han publicado trabajos similares con residuos de aceite de colza (Sheabar & Neeman, 1988) o bagazo de uva (Pazos, Gallardo, Torres & Medina, 2005, Pazos, Alonso, Fernández-Bolaños, Torres & Medina, 2006). En esta sección se exponen de una manera más detallada los residuos utilizados para el desarrollo de esta tesis como fuente de aditivos con capacidad antioxidante: bagazo de uva, corteza de pino y corteza de Hamamelis.

5.2.1. Bagazo de uva (*Vitis vinifera*)



La uva es la fruta más cosechada, con una producción anual estimada en más de 42 millones de toneladas (Makris, Boskou, Andrikopoulos & Kefalas, 2008). Se estima que hasta un 13 % del peso total está constituido por residuos sobrantes en la elaboración de los vinos (Torres et al., 2002). Solo en Europa, se generan anualmente unos 14,5 millones de toneladas de subproductos de uvas en el proceso de obtención del vino (Makris, Boskou, Andrikopoulos & Kefalas, 2008). No es sorprendente que hayan atraído un gran interés con respecto a otros subproductos agrícolas ya que, además de poder obtenerse a muy bajo precio, estos materiales superfluos contienen una alta concentración de sustancias con capacidad antioxidante (Pinelo, Arnous & Meyer, 2006). El bagazo de uva es el residuo constituido por el hollejo o piel de la uva, las semillas y los cabos de los racimos generados en el proceso de obtención del vino. Los compuestos fenólicos se encuentran principalmente en la piel y la pepita. En la pulpa destaca la presencia de los ácidos fenólicos simples como los ácidos gálico, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico (Leighton & Urquiaga, 2000), mientras que el hollejo y la pepita están constituidos mayoritariamente por flavonoides del tipo antocianidinas, flavanoles, flavonoles glicosilados y flavonoides oligoméricos (Girard & Mazza, 1998). Torres, Varela, García, Carilla, Matito, Centelles, Cascante, Sort & Bobet (2002) separaron y caracterizaron distintas fracciones obtenidas a partir de un extracto de uva blanca Parellada y posteriormente estudiaron su capacidad antioxidante en sistemas in vitro además de en emulsiones de aceite en agua. Las fracciones con grado de polimerización comprendido entre 3 y 4 y un 30 % de galoización resultaron las más efectivas en emulsiones de aceite en agua. Pazos, Gallardo, Torres & Medina (2005) utilizaron esas mismas fracciones como aditivos en músculo de pescado congelado y seleccionaron la combinación del grado de polimerización y del porcentaje de galoización más activa para retardar el proceso de oxidación lipídica. Sánchez-Alonso & Borderías, (2008) demostraron la inhibición la oxidación lipídica mediante la adición de fibra obtenida a partir de uva blanca (variedad Airén) sobre músculo de pescado congelado, sugiriendo su utilización como aditivo en músculo de pescado o como componente de distintos tipos de alimentos funcionales.

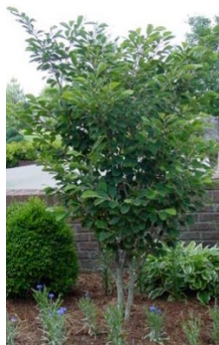
5.2.2. Corteza de pino (*Pinus pinaster*)



La madera de pino es utilizada comercialmente para la producción de pasta de papel o tableros, pero la corteza es extraída antes del proceso de astillado debido su alto contenido de lignina y polifenoles que producen dificultades en el tratamiento. La corteza es usada, sobre todo, como combustible pero aun así, se deshecha un enorme exceso como residuo superfluo. El valor comercial de la corteza de pino ha sido demostrado en diversos estudios. El ejemplo más típico es la patente del Pycnogenol®, un extracto de la variedad de pino *Pinus maritima* utilizado como suplemento alimenticio para combatir las consecuencias negativas derivadas del estrés oxidativo. Los compuestos fenólicos más abundantes en la corteza de pino son (+)-catequina, (-)-epicatequina, dihidroquercetina, ácidos fenólicos y taninos (dímeros, trímeros y oligómeros) (Wood, 2002). Los taninos están formadas fundamentalmente por subunidades de flavan-3-oles unidos mediante enlaces C4-C8 (Ku, Jang & Mun, 2007) y se encuentran tanto del tipo extraíbles con disolventes orgánicos, como no extraíbles. La relación entre ambos tipos es muy importante debido a que la cantidad de proantocianidinas extraíbles está considerado como un factor significativo en el valor comercial del residuo. Touriño, Selga, Jiménez, Juliá, Lozano, Lizárraga, Cascante, & Torres (2005) obtuvieron distintas fracciones con diferentes tipos de polifenoles a partir de corteza de pino de la especie *Pinus pinaster* y determinaron su eficacia antioxidante además de su influencia en la proliferación de células tumorales y su capacidad para inducir apoptosis. Estructuralmente, las fracciones obtenidas resultaron altamente homólogas a las previamente obtenidas a partir del bagazo de uva, por el mismo grupo de investigación (Ugartondo, Mitjans, Touriño, Torres & Vinardell, 2007) con la salvedad de que las obtenidas a partir de corteza de pino no presentaron galoización (presencia de ésteres galato, Fig. 26). Los ésteres galato proporcionan una alta capacidad antiradicalaria por lo que su influencia es fundamental en la actividad antioxidante de los polifenoles (Ugartondo, Mitjans, Touriño, Torres & Vinardell, 2007). Por otra parte, existen diversos estudios que relacionan la presencia del grupo pirogalol, presente en los ésteres galato, con posibles efectos adversos para la salud (Kondo, Kurihara, Miyata, Suzuki & Toyoda, 1999). El residuo de pino se encuentra disponible durante todo el año, es más abundante y más barato que el bagazo de uva, por lo que se convierte en una opción atractiva como fuente residual de compuestos antioxidantes.

5.2.3. Corteza de Hamamelis (*Hamamelis virginiana*)

“*Hamamelis virginiana*” es un arbusto procedente de América del norte que se caracteriza por poseer múltiples funciones terapéuticas relacionadas con su capacidad antioxidante. Entre éstas destacan sus propiedades antihemorrágicas (Laux & Oschmann, 1993) o antiinflamatorias



(Erdelmeier, Cinatl Jr., Rabenau, Doerr, Biber & Koch, 1996), siendo los extractos y destilados de la corteza y las hojas ampliamente utilizados como productos del cuidado de la piel, protectores solares o cicatrizantes (Korting, Schafer-Korting, Klovekorn, Klovekorn, Martin & Laux, 1995). Entre sus componentes químicos destaca su elevado porcentaje de taninos (no menor del 7 %). El Hamamelitanino (2'5-di-O-galloil hamamelosa, Fig. 27) es el mayor constituyente polifenólico y su porcentaje es hasta 31 veces mayor en la corteza

que en las hojas (Carretero, 2000). La corteza contiene un alto porcentaje de proantocianidinas además de otros compuestos fenólicos como ácido gálico libre o distintos tipos de flavonoides (miricetina, quercetina y kampferol). Además de las capacidades antiradicalaria, quelatante y reductora que presentan este tipo de sustancias, se ha demostrado que el hamamelitanino y las

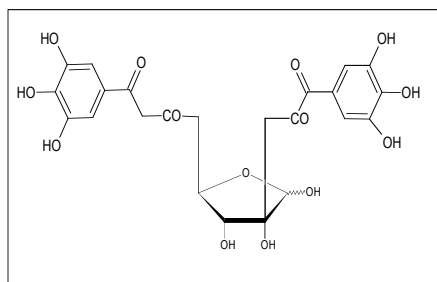


Figura 27: Estructura del Hamamelitanino

proantocianidinas extraídas de la corteza son potentes inhibidores de la 5-LOX, enzima catalizadora de la oxidación lipídica (Hartisch & Kolodziej, 1996). Touriño, Lizárraga, Carreras, Lorenzo, Ugartondo, Mitjans, Vinardell, Juliá, Cascante & Torres (2008) evaluaron el contenido polifenólico de diversas fracciones de corteza de Hamamelis utilizando una metodología análoga a la utilizada en la obtención de fracciones de bagazo de uva y corteza de pino (Torres,

Varela, García, Carilla, Matito, Centelles, Cascante, Sort & Bobet, R, 2002, Touriño, Selga, Jiménez, Juliá, Lozano, Lizárraga, Cascante, & Torres, 2005). Los autores mostraron que las fracciones extraídas de Hamamelis presentan una capacidad antioxidante *in vitro* mayor que las de pino. La composición de las fracciones IVH y OWH, procedentes de corteza de Hamamelis fue estudiada por Medina, Torres, & González (2009), resultando diferente a la de sus homólogas obtenidas a partir de bagazo de uva y corteza de pino dado su alto contenido en taninos hidrolizables. La actividad antioxidante de la fracción IVH fue testada sobre músculo de jurel sometido a tratamiento térmico. La hidrólisis de la fracción, derivada del incremento de temperatura, y el consecuente

aumento del contenido de ácido gálico incrementó la actividad antioxidante de la fracción con respecto a la no hidrolizada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abuja, P. M., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant and Prooxidant Activities of Elderberry (*Sambucus nigra*) Extract in Low-Density Lipoprotein Oxidation. *J.Agric.Food Chem.*, 46(10), 4091-4096.
- Ackman, R. G. (1994). Seafood lipids. In F. Shahidi, & J. R. Botta, *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality* (pp. 34-48). London: Chapman & Hall.
- Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Prior, R. L., Cao, G., Jacobs, P. H., Kremers, B. G., Hammerstone, J. F., Rucker, R. B., Ritter, K. A., & Schmitz, H. H. (1999). HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Capacity. *J.Agric.Food Chem.*, 47(10), 4184-4188.
- Agócs, A., Nagy, V., Szabó, Z., Márk, L., Ohmacht, R., & Deli, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 8(3), 390-394.
- Alasalvar, C., Taylor, K. D., & Shahidi, F. (2005). Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. *J.Agric.Food Chem.*, 53(7), 2616-2622.
- Alberola, J., & Izquierdo L. J. (1978). The volatile fraction of orange juice. Method for extraction and study of composition. In G. Charalambous & G. E. Inglett., *Flavor of foods and beverages. Chemistry and Technology*. (pp. 283-303) New York: Academic Press.
- Allen, J. C., & Hamilton, R. J. (1994). *Rancidity in Foods*. New York: Chapman & Hall.
- Aro, T., Brede, C., Manninen, P., & Kallio, H. (2002). Determination of Semivolatile Compounds in Baltic Herring (*Clupea harengus membras*) by Supercritical Fluid Extraction–Supercritical Fluid Chromatography–Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J.Agric.Food Chem.* 50(7), 1970-1975.
- AOCS, 1998. AOCS, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 18-90. , AOCS, Champaign, IL (1998).
- Aubourg, S. P. (1999). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(4), 409-419.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. M. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37(8), 693-704.
- Barat, J.M., Gil, L., García-Breijo, E., Aristoy, M.-C., Toldrá, F., Martínez-Máñez, R., & Soto, J. (2008). Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chem.*, 108(2), 681-688.
- Baron, C. P., & Andersen, H. J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J.Agric.Food Chem.*, 50(14), 3887-3897.
- Béné, A., Hayman, A., Reynard, E., Luisier, J. L., & Villettaz, J. C. (2001). New method for the rapid determination of volatile substances: The SPME-direct method. Part II. Determination of the freshness of fish. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 72(3), 204-207.

- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., & Van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem. Tox.*, 38(7), 599-605.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 9(15), 1551-1558.
- Buettner, G. A., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid. In E. Cadenas, & L. Packer, *Handbook of antioxidants* (pp. 91-115). New York: Dekker.
- Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 300(2), 535-543.
- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J.Agric.Food Chem.*, 49(6), 2774-2779.
- Burt, J. R., & Hardy, R. (1992). Composition and deterioration of pelagic fish. In J. R. Burt, R. Hardy, & K. J. Whittle, *Pelagic Fish. The Resource and its exploitation* (pp. 115-141). Cambridge: Blackwell Scientific Publications Inc.
- Burton, G. W., & Ingold, K. U. (1984). β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649), 569-573.
- Buttery, R. G., Stern, D. J., & Ling, L. C. (1994). Studies on flavor volatiles of some sweet corn products. *J.Agric.Food Chem.*, 42(3), 791-795.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5), 749-760.
- Carando, S., Teissedre, P., Pascual-Martinez, L., & Cabanis, J. (1999). Levels of Flavan-3-ols in French Wines. *J.Agric.Food Chem.*, 47(10), 4161-4166.
- Carretero, E. (2000). Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama actual del medicamento*, 24(235), 633-636.
- Cerkauskiene, R., Kaminskas, A., Kaltenis, P., & Vitkus, D. (2003). Influence of omega-3 fatty acids on lipid metabolism in children with steroid sensitive nephrotic syndrome. *Medicina (Kaunas)*, 39 Suppl 1, 82-87.
- Cleland, L. G., James, M. J., & Proudman, S. M. (2003). The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs*, 63(9), 845-853.
- Cha, Y. J., & Cadwallader, K. R. (1995). Volatile Components in Salt-Fermented Fish and Shrimp Pastes. *J. Food Sci.*, 60(1), 19-24.
- Cha, Y. J., & Cadwallader, K. R. (1998). Aroma-Active Compounds in Skipjack Tuna Sauce. *J.Agric.Food Chem.*, 46(3), 1123-1128.
- Chan, S. H. (1987). *Autoxidation of unsaturated lipids*. London: Adademic Press.
- Chan, S. T., Yao, M. W. Y., Wong, Y. C., Wong, T., Mok, C. S., & Sin, D. W. M. (2006). Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Eur.Food Res.Technol.*, 224(1), 67-74.
- Chan, W. K. M., Faustman, C., & Decker, E. A. (1997). Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. *J.Food.Sci.*, 62(4), 709-712.

- Chapman, R. A., & Mackay, K. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *Journal of the American oil chemists society*, 26, 360-363.
- Chen, W. J., & Yeh, S. (2003). Effects of fish oil in parenteral nutrition. *Nutrition*, 19(3), 275-279.
- Cholbi, M. R., Paya, M., & Alcaraz, M. J. (1991). Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, 47(2), 195-199.
- Chopin, C., Kone, M., & Serot, T. (2007). Study of the interaction of fish myosin with the products of lipid oxidation: The case of aldehydes. *Food Chem.*, 105(1), 126-132.
- Chung, H. Y., Yeung, C. W., Kim, J., & Chen, F. (2007). Static headspace analysis-olfactometry (SHA-O) of odor impact components in salted-dried white herring (*Ilisha elongata*). *Food Chem.*, 104(2), 842-851.
- Da Cunha Veloso, M. C., Da Silva, V. M., Santos, G. V., & De Andrade, J. B. (2001). Determination of aldehydes in fish by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.Sci.*, 39(5), 173-176.
- De Fátima Alpendurada, M. (2000). Solid-phase microextraction: A promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J.Chromatogr.A*, 889(1-2), 3-14.
- Decker, E. A., Livisay, S. A., & Zoy, S. (2000). Mechanisms of endogenous skeletal muscle antioxidants: Chemical and Physical aspects. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote, *Antioxidants in muscle foods* (pp. 25-60). New York.: John Wiley & Sons, Inc.
- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *J.Agric.Food Chem.*, 53(10), 4303-4310.
- Decker, E. A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci.Technol.*, 9(6), 241-248.
- Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J. F., & Malle, P. (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 86(4), 600-611.
- Duflos, G., Moine, F., Coin, V. M., & Malle, P. (2005). Determination of volatile compounds in whiting (*Merlangius merlangus*) using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. Sci.*, 43(6), 304-312.
- Dyerberg, J., Bang, H. O., & Hjerne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am.J. Clin. Nutr.*, 28(9), 958-966.
- Edirisinghe, R. K. B., Graffham, A. J., & Taylor, S. J. (2007). Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC-MS and their relationship to fish quality parameters. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 42(10), 1139-1147.
- El Barbri, N., Llobet, E., El Bari, N., Correig, X., & Bouchikhi, B. (2008). Application of a portable electronic nose system to assess the freshness of Moroccan sardines. *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Supramol. Syst.*, 28(5-6), 666-670.
- El Barbri, N., Amari, A., Vinaixa, M., Bouchikhi, B., Correig, X., & Llobet, E. (2007). Building of a metal oxide gas sensor-based electronic nose to assess the freshness of sardines under cold storage. *Sens. Actuators, B Chem.*, 128(1), 235-244.

- Erdelmeier, C. A. J., Cinatl Jr., J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Biber, A., & Koch, E. (1996). Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark. *Planta Med.*, 62(3), 241-245.
- Erickson, M. C. (2002). Lipid oxidation of muscle foods. In C. C. Akoh, & D. B. Min, *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology* (pp. 365-411). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Erickson, M. C., & Hultin, H. O. (1992). Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292(2), 427-432.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochem.*, 68, 2896-3008.
- FAO (1999). Documento técnico de pesca 348. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. H.H. Huss.
- FAO (2002). FAOSTAT Database Collections. Agricultural Production Indices.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid Oxidation*. West Ferry, Dundee, Scotland: The Oily Press LTD.
- Frankel, E. N. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Prog.Lipid Res.*, 22(1), 1-33.
- Fuhrman, B., Buch, S., Vaya, J., Belinky, P. A., Coleman, R., Hayek, T., & Aviram, M. (1997). Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: In vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66(2), 267-275.
- Ganeko, N., Shoda, M., Hirohara, I., Bhadra, A., Ishida, T., Matsuda, H., Takamura, H. & Matoba, T. (2008). Analysis of volatile flavor compounds of sardine (*Sardinops melanostica*) by solid phase microextraction. *J. Food Sci.* 73(1), S83-S88.
- German, J. B., Zhang, H., & Berger, R. (1992). Role of lipoxygenases in lipid oxidation in foods. In St. Angelo, A. J., *Lipid Oxidation in Foods*. (pp. 74-92). Washington: ACS Symposium Series 500. American Chemical Society.
- German, J. B., & Hu, M. L. (1990). Oxidant stress inhibits the endogenous production of lipoxygenase metabolites in rat lungs and fish gills. *Free Radic. Biol. Med.*, 8(5), 441-448.
- German, J. B., & Creveling, R. K. (1990). Identification and characterization of a 15-lipoxygenase from fish gills. *J.Agric.Food Chem.*, 38(12), 2144-2147.
- German, J. B., Chen, S. E., & Kinsella, J. E. (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic initiation via lipoxygenase. *J.Agric.Food Chem.*, 33(4), 680-683.
- Girard, B., & Nakai, S. (1993). Species differentiation by multivariate analysis of headspace volatile patterns from canned pacific salmon. *J. Aquat. Food Prod. Tech.*, 2(1), 51-68.
- Girard, B. and Mazza, G. (1998). Functional grape and citrus products. In G. Mazza, *Functional Foods. Biochemical & Processing Aspects*. Lancaster: Ed. Technomic Publishing Company, Inc.
- Girard, B., & Nakai, S. (1994). Grade Classification of Canned Pink Salmon with Static Headspace Volatile Patterns. *J. Food Sci.*, 59(3), 507-512.
- Górecki, T., & Pawliszyn, J. (1997). Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction: Part I. Theoretical considerations. *Analyst*, 122(10), 1079-1086.

- Gray, J. I. (1992). Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in Pork. *J.Agric.Food Chem.*, 40(8), 1310-1315.
- Grigorakis, K., Taylor, K. D. A., & Alexis, M. N. (2003). Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture*, 225(1-4), 109-119.
- Grün, I.U., Barbeau, W.E., Crowther, J.B. (1996). Changes in Headspace Volatiles and Peroxide Values of Undeodorized Menhaden Oil over 20 Weeks of Storage. *J.Agric.Food Chem.*, 44(5), 1190-1194.
- Guillén, M. D., Errecalde, M. C., Salmerón, J., & Casas, C. (2006). Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.*, 94(1), 151-156.
- Guillén, M. D., & Errecalde, M. C. (2002). Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 82(9), 945-952.
- Hallier, A., Prost, C., & Serot, T. (2005). Influence of Rearing Conditions on the Volatile Compounds of Cooked Fillets of *Silurus glanis* (European Catfish). *J.Agric.Food Chem.*, 53(18), 7204-7211.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M. C. (1985). *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246(2), 501-514.
- Hamilton, R. J., Kalu, C., McNeill, G. P., Padley, F. B., & Pierce, J. H. (1998). Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil. *JAOCs.J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75(7), 813-822.
- Harris, P., & Tall, J. (1989). Rancidity in fish. In J. C. Allen, & R. J. Hamilton, *Rancidity in Foods* (pp. 256-273). London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Hartisch, C., & Kolodziej, H. (1996). Galloylhamameloses and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*. *Phytochem.*, 42(1), 191-198.
- Hartvigsen, K., Lund, P., Hansen, L. F., & Holmer, G. (2000). Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonnaise during storage. *J.Agric.Food Chem.*, 48(10), 4858-4867.
- Hasegawa, K., Endo, Y., & Fujimoto, K. (1992). Oxidative Deterioration in Dried Fish Model Systems Assessed by Solid Sample Fluorescence Spectrophotometry. *J. Food Sci.*, 57(5), 1123-1126.
- Haugen, J. E., & Undeland, I. (2003). Lipid oxidation in herring fillets (*Clupea harengus*) during ice storage measured by a commercial hybrid gas-sensor array system. *J.Agric.Food Chem.*, 51(3), 752-759.
- He, Y., & Shahidi, F. (1997). Antioxidant Activity of Green Tea and Its Catechins in a Fish Meat Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 45(11), 4262-4266.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13(10), 572-584.

- Hsieh, R. J., & Kinsella, J. E. (1989). Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish. In John E. Kinsella, *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 33 (pp. 233-341) San Diego: Academic Press.
- Hsieh, R. J., German, J. B., & Kinsella, J. E. (1988). Relative inhibitory potencies of flavonoids on 12-lipoxygenase of fish gill. *Lipids*, 23(4), 322-326.
- Hsieh, R. J., & Kinsella, J. E. (1989). Lipoxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *J.Agric.Food Chem.*, 37(2), 279-286.
- Hsieh, R. J., German, J. B., & Kinsella, J. E. (1988). Lipoxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. *J.Agric.Food Chem.*, 36(4), 680-685.
- Hultin, H. O. (1992). Lipid oxidation in fish muscle. In G. J. Flick, & R. E. Martin, *Advance in seafood biochemistry. Compositon and quality.* (pp. 99-122). Lancaster, Basel: Technomic publishing Co., Inc.
- Hultin, M., Mullertz, A., Zundel, M. A., Olivecrona, G., Hansen, T. T., Deckelbaum, R. J., Carpentier, Y. A., & Olivecrona, T. (1994). Metabolism of emulsions containing medium- and long-chain triglycerides or interesterified triglycerides. *J. Lipid Res.*, 35(10), 1850-1860.
- Igene, J. O., King, J. A., Pearson, A. M., & Gray, J. I. (1979). Influence of heme pigments, nitrite, and non-heme iron on development of warmed-over flavor (WOF) in cooked meat. *J.Agric.Food Chem.*, 27(4), 838-842.
- Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., & Musci, M. (2009). Study of the volatile compounds for the characterization of fresh and frozen-thawed cultured Gilthead Sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry. *Food Chem*, (En prensa).
- Jalil, A. M. M., & Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190-2219.
- Jacobsen, C., (1999). Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 101, 484-492.
- Jensen, F. B, Fago, A., & Weber, R. E. (1998). Hemoglobin structure and function. In S. F. Perry & B. Tufts *Fish Respiration* (pp. 1-40). San Diego: Academic Press.
- Joaquin, H. J. F., Tolasa, S., Oliveira, A. C. M., Lee, C. M., & Lee, K. H. (2008). Effect of Milk Protein Concentrate on Lipid Oxidation and Formation of Fishy Volatiles in Herring Mince (*Clupea harengus*) during Frozen Storage. *J.Agric.Food Chem.*, 56(1), 166-172.
- Jónsdóttir R., Bragadóttir, M., & Olafsdottir, G. (2007). The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *J. Aquat. Food Prod. Tech.*, 16(4), 67-86.
- Jónsdóttir, R., Bragadóttir, M., & Arnarson, G.Ö. (2005). Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *J. Food Sci.*, 70(7), C433-C440.
- Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Chanie, E. & Haugen, J.E. (2008). Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). *Food Chem.* 109(1), 184-195.
- Jonsdottir, R., Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Stefansson, G. (2004). Flavor characterization of ripened cod roe by gas chromatography, sensory analysis, and electronic nose. *J.Agric.Food Chem.* 52 (20), 6250-6256

- Josephson D. B., & Lindsay R. C. (1987). Retro-aldol degradations of unsaturated aldehydes: Role in the formation of c4-heptenal from t2, c6-nonadienal in fish, oyster and other flavors. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(1), 132-138.
- Josephson, D. B., & Lindsay, R. C. (1986). Enzymic generation of volatile aroma compounds from fresh fish. In M. J. Comstock *ACS Symposium series - American Chemical Society (USA) (n° 30)* (pp. 201-219).
- Josephson, D.B. (1991) Seafood. In H. Maarse & M. Dekker *Volatile compounds in foods and beverages*, (pp. 179-202) New York:Marcel Dekker Inc.
- Josephson, D. B., Lindsay, R. C., & Stuijber, D. A. (1984). Variations in the occurrences of enzymically derived volatile aroma compounds in salt- and freshwater fish. *J.Agric.Food Chem.*, 32(6), 1344-1347.
- Kagan, V.E., Nohl, H. and Quinn, P.J (1996). Coenzyme Q: Its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In E. Cadenas and L. Packer, *Handbook of Antioxidants* (pp. 157-201). New York: Marcel Dekker.
- Kanavouras, A., Kiritsakis, A., & Hernandez, R. J. (2005). Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chem.*, 90(1-2), 69-79.
- Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Sci.*, 36(1-2), 169-189.
- Kanner, J., & Harel, S. (1985). Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. *Arch.Biochem.Biophys.*, 237(2), 314-321.
- Kanner, J., & Kinsella, J. E. (1983). Initiation of lipid peroxidation by a peroxidase/hydrogen peroxide/halide system. *Lipids*, 18(3), 204-210.
- Karahadian, C., & Lindsay, R. C. (1989). Evaluation of compounds contributing characterizing fishy flavors in fish oils. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66(7), 953-960.
- Kawai, T. (1996). Fish Flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36(3), 257-298.
- Ke, P. J., Ackman R. G., Linke, B. A., & Nash, D. M., (1977). Differential lipid oxidation in various parts of frozen mackerel. *Int.J. Food Sci. Technol.*, 12(1), 37-47.
- Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and definition. *Nat.Prod.Rep.*, 18(6), 641-649.
- Kolakowska, A., Olley, J. & Dunstan, G. A. (2000). Fish lipids. In Z. E. Sikorski and A. Kolakowska, *Chemical and functional properties of food lipids*. (pp. 221-264). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., & Toyoda, M. (1999). Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Arch.Biochem.Biophys.*, 362(1), 79-86.
- Korting, H. C., Schafer-Korting, M., Klovekorn, W., Klovekorn, G., Martin, C., & Laux, P. (1995). Comparative efficacy of Hamamelis distillate and hydrocortisone cream in atopic eczema. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 48(6), 461-465.
- Ku, C. S., Jang, J. P., & Mun, S. P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *J.Wood Sci.*, 53(6), 524-528.
- Kulås,E., Olsen,E., & Ackman, R. G. (2002). Effect of α -, γ -, and δ -tocopherol on the distribution of volatile secondary oxidation products in fish oil. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 104(8), 520-529.

- Labuza, T. P., Silver, M., Cohn, M., Heidelbaugh, N. D., & Karel, M. (1971). Metal-catalyzed oxidation in the presence of water in foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48(10), 527-531.
- Ladikos, D., & Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem.*, 35(4), 295-314.
- Lampi, A. M., Kataja, L., Kamal-Eldin, A., & Vieno, P. (1999). Antioxidant activities of α - and γ -tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(6), 749-755.
- Laudicina, D. C., & Marnett, L. J. (1990). Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 278(1), 73-80.
- Laux, P., & Oschmann, R. (1993). Witch hazel - Hamamelis virginiana L., *Z. Phytother.*, 14(3), 155-166.
- Leighton, F. and Urquiaga (2000). Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y calidad de vida*, 7, 5-13.
- Likens, S. T., & Nickerson, G. B. (1964). Determination of certain hop oil constituents in brewing products. *American Society of Brewing Chemists Processes*, 5-13.
- Lindsay, R. C. (1990). Fish flavours. *Food Rev. Int.*, 6, 437-455.
- Liu, Y. J., & Pan, B. S. (2004). Inhibition of Fish Gill Lipoxigenase and Blood Thinning Effects of Green Tea Extract. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15), 4860-4864.
- Lizárraga, D., Lozano, C., Briede J. J., Van Delft, J. H., Touriño, S., Centelles, J. J., Torres, J. L., & Cascante, M. (2007). The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative properties of procyanidin-rich natural extracts. *FEBS J.*, 274(18), 4802-4811.
- Lovegrove, J. A., Clohessy, A., Milon, H., & Williams, C. M. (2000). Modest doses of β -glucan do not reduce concentrations of potentially atherogenic lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72(1), 49-55.
- Lubis, Z., & Buckle, K. A. (1990). Rancidity and lipid oxidation of dried-salted sardines. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 25(3), 295-303.
- Madrid A., Madrid J. (2000). *Los aditivos en los alimentos: Según la Unión Europea y la legislación española*. Madrid : Mundi-Prensa Libros.
- Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K., & Kefalas, P. (2008). Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.*, 226(5), 1075-1079.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., Flavonoids: Properties and antioxidizing action. *Nutr. Hosp.*, 17(6), 271-278.
- Medina, I., Lois, S., Lizárraga, D., Pazos, M., Touriño, S., Cascante, M., & Torres, J. L. (2006). Functional Fatty Fish Supplemented with Grape Procyanidins. Antioxidant and Proapoptotic Properties on Colon Cell Lines. *J. Agric. Food Chem.*, 54(10), 3598-3603.
- Medina, I., Satué-Gracia, M. T., & Frankel, E. N. (1999). Static Headspace Gas Chromatographic Analyses to Determine Oxidation of Fish Muscle Lipids during Thermal Processing. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(2), 231-236.

Medina, I., Torres, J. L., & González, M. J. (2009) Impact of thermal processing on the activity of gallotannins and condensed tannins fo Hamamelis Virginiana used as finctional ingredients in seafood. *J.Agric.Food Chem.*, (Enviado).

Melton, L. (2006). The antioxidant myth: a medical fairy tale. *New Sci.*, 2563, 40-43.

Mohri, S., Cho, S. Y., Endo, Y., & Fujimoto, K. (1992). Linoleate 13(S)-lipoxygenase in sardine skin. *J.Agric.Food Chem.*, 40(4), 573-576.

Morales, M. T., & Aparicio, R. (1993). Optimization by mathematical procedures of two dynamic headspace techniques for quantifying virgin olive oil volatiles. *Anal.Chim.Acta*, 282(2), 423-431.

Niki, E. (1996). Alpha-tocopherol. In E. Cadenas, & L. Packer, *Handbook of Antioxidants* (pp. 3-25). New York: Marcel Dekker.

Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., & Kamiya, Y. (1982). Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem. Lett.*, 11(6), 789-792.

Nordvi, B., Langsrud, O., Egelanddal, B., Slinde, E., Vogt, G., Gutierrez, M., & Olsen, E., (2007). Characterization of volatile compounds in a fermented and dried fish product during cold storage. *J. Food Sci.*, 72(6), S373-S380.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J.Agric.Food Chem.*, 53(4), 823-837.

Oliveira, A. C. M., Crapo, C. A., Himelbloom, B., Vorholt, C., & Hoffert, J. (2005). Headspace gas chromatography-mass spectrometry and electronic nose analysis of volatile compounds in canned Alaska pink salmon having various grades of watermarking. *J. Food Sci.*, 70(7), S419-S426.

Overton, S. V., & Manura, J. J. (1995). Analysis of Volatile Organics in Cooking Oils by Thermal Desorption Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J.Agric.Food Chem.*, 43(5), 1314-1320.

Packer, L., Rimbach, G., & Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (pinus maritima) bark, pycnogenol. *Free Radic.Biol.Med.*, 27(5-6), 704-724.

Parthasarathy, S., Quinn, M. T., & Steinberg, D. (1988). Is oxidized low density lipoprotein involved in the recruitment and retention of monocyte/macrophages in the artery wall during the initiation of atherosclerosis? *Basic Life Sci*, 49, 375-380.

Pazos, M. (2005). Inhibición de la oxidación lipídica en el músculo de pescado mediante la utilización de polifenoles obtenidos a partir del bagazo de uva. Tesis doctoral. Santiago de Compostela, Universidad de Santiago de Compostela.

Pazos, M., Alonso, A., Fernández-Bolaños, J., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *J.Agric.Food Chem.*, 54(2), 366-373.

Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.*, 92(3), 547-557.

Pazos, M., González, M. J., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *Eur. Food Res. Tech.*, 220(5-6), 514-519.

- Pazos, M., Medina, I., & Hultin, H. O. (2005). Effect of pH on hemoglobin-catalyzed lipid oxidation in cod muscle membranes in vitro and in situ. *J.Agric.Food Chem.*, 53(9), 3605-3612.
- Pazos, M., Sánchez, L., & Medina, I. (2005). α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. *J.Agric.Food Chem.*, 53(10), 4000-4005.
- Pedlar, R. M., Ptashynski, M. D., Evans, R., & Klaverkamp, J. F. (2002). Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.*, 57(3), 167-189.
- Penton, Z. E. (1996). Three modes of sample introduction with a single GC autosampler: Liquid injection, headspace, and solid-phase microextraction. *Am. Lab.*, 28(7) 18B-18D.
- Petillo, D., Hultin, H. O., Krzynowek, J., & Autio, W. R. (1998). Kinetics of Antioxidant Loss in Mackerel Light and Dark Muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 46(10), 4128-4137.
- Pham, A. J., Schilling, M. W., Yoon, Y., Kamadia, V. V., & Marshall, D. L. (2008). Characterization of fish sauce aroma-impact compounds using GC-MS, SPME-Osme-GCO, and Stevens' Power Law exponents. *J.Food.Sci.*, 73(4) C268-C274.
- Piggot, G. M. (1976). New approaches to marketing fish. In A. M. Altschul, *New Protein Foods* (pp. 1-37). New York: Academic Press.
- Pillonel, L., Bosset, J. O., & Tabacchi, R. (2002). Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *LWT - Food Sci. Tech.*, 35(1), 1-14.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci.Technol.*, 17(11), 579-590.
- Pokorny, J., & Yanishlieva, N. (2005). *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas.* : Acirbia.
- Pozo, R., Lavety, J., & Love, R. M. (1988). The role of dietary α -tocopherol (vitamin E) in stabilising the canthaxanthin and lipids of rainbow trout muscle. *Aquaculture*, 73(1-4), 165-175.
- Prost, C., Hallier, A., Cardinal, M., Serot, T., & Courcoux, P. (2004). Effect of storage time on raw sardine (*Sardina pilchardus*) flavor and aroma quality. *J.Food.Sci.*, 69(5), S198-S204.
- Prost, C., Serot, T., & Demaimay, M. (1998). Identification of the Most Potent Odorants in Wild and Farmed Cooked Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J.Agric.Food Chem.*, 46(8), 3214-3219.
- Refsgaard, H. H. F., Haahr, A., & Jensen, B. (1999). Isolation and Quantification of Volatiles in Fish by Dynamic Headspace Sampling and Mass Spectrometry. *J.Agric.Food Chem.*, 47(3), 1114-1118.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contributions of Blood and Blood Components to Lipid Oxidation in Fish Muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 50(3), 555-564.
- Richards, M. P., Modra, A. M., & Li, R. (2002). Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Sci.*, 62(2), 157-163.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2000). Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: A possible role for deoxyhemoglobin. *J.Agric.Food Chem.*, 48(8), 3141-3147.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66(4), 401-436.

- Rodríguez De Sotillo, D., Hadley, M., & Holm, E. T. (1994). Potato peel waste: Stability and antioxidant activity of a freeze-dried extract. *J. Food Sci.*, 59(5), 1031-1033.
- Roh, H. S., Park, J. Y., Park, S. Y., & Chun, B. S., (2006). Isolation of off-flavors and odors from tuna fish oil using supercritical carbon dioxide. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 11(6), 496-502.
- Ross, C. F., & Smith, D. M. (2006). Use of volatiles as indicators of lipid oxidation in muscle foods. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.*, 5(1), 18-25.
- Saeed, S., & Howell, N. K. (2001). 12-lipoxygenase activity in the muscle tissue of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and its prevention by antioxidants. *J. Sci. Food Agric.*, 81(8), 745-750.
- Sajilata, M. G., Bajaj, P. R., & Singhal, R. S. (2008). Tea polyphenols as nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 7(3), 229-254.
- Sakakibara, H., Ide, J., Yanai, T., Yajima, I., & Hayashi, K. (1990). *Agric. Biol. Chem.*, 54(1), 9-16.
- Sánchez-Alonso, I., & Borderías, A. J. (2008). Technological effect of red grape antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43(6), 1009-1018.
- Santos, G. V., Da Cunha Veloso, M. C., De Paula, P. A., & De Andrade, J. B. (2001). Fish off-flavor analysis by headspace and off-line purge-and-trap followed by HRGC-MS. *Am. Lab.*, 33(24), 28-30.
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 910(2), 265-273.
- Schnepf, M., Spencer, G. & Carlort, J., (1991). Chemical and sensory characteristics of stored menhaden oil/soybean oil blends. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(5), 281-284.
- Seman, D. L., Decker, E. A., & Crum, A. D. (1991). Factors Affecting Catalysis of Lipid Oxidation by a Ferritin containing Extract of Beef Muscle. *J. Food Sci.*, 56(2), 356-358.
- Sen, N. P. (1991). Recent studies in Canada on the occurrence and formation of N-nitroso compounds in foods and food contact materials. *IARC Sci. Publ.*, (105), 232-234.
- Serafini, M. (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, 34(12), 533-535.
- Sheabar, F. Z., & Neeman, I. (1988). Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(6), 990-993.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 131S - 132S.
- Simopoulos, A. P. (1994). The future of fatty acids in human nutrition: health and policy implications. *World Rev Nutr Diet*, 75, XV-XIX.
- Soares, S. E. (2002). Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.*, 15(1), 71-81.
- Spinelli, J. & Dassow, J. A. (1982). Fish proteins: Their modification and potential uses in the food industry. In R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard & D. R. Ward, *Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products* (pp. 13-37). Westport, Connecticut: AVI Publishing Company.
- Tang, S., Sheehan, D., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., & Kerry, J. P. (2001). Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 36(6), 685-692.

- Torres, J. L., Varela, B., García, M. T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J. J., Cascante, M., Sort, X., & Bobet, R. (2002). Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J.Agric.Food Chem.*, 50(26), 7548-7555.
- Touriño, S., Lizárraga, D., Carreras, A., Lorenzo, S., Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Juliá, L., Cascante, M., & Torres, J. L. (2008). Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark: Electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chem.Res.Toxicol.*, 21(3), 696-704.
- Touriño, S., Selga, A., Jiménez A., Juliá, L., Lozano, C., Lizárraga, D., Cascante, M., & Torres, J. L. (2005). Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and Antiproliferative effect in melanoma cells. *J.Agric.Food Chem.*, 53(12), 4728-4735.
- Triqui, R. (2006). Sensory and flavor profiles as a means of assessing freshness of hake (*Merluccius merluccius*) during ice storage. *Eur. Food Res. Technol.* 222(1-2), 41-47.
- Triqui, R., & Bouchriti, N. (2003). Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of Overall Sensory Changes to Instrumentally Determined Volatiles. *J.Agric.Food Chem.*, 51(26), 7540-7546.
- Tully, A. M., Roche, H. M., Doyle, R., Fallon, C., Bruce, I., Lawlor, B., Coakley, D., & Gibney, M. J. (2003). Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: A case-control study. *Br. J. Nutr.*, 89(4), 483-489.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Touriño, S., Torres, J. L., & Vinardell, M.P., Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chem.Res.Toxicol.*, 20(10), 1543-1548.
- Undeland, I., Kristinsson, H. G., & Hultin, H. O. (2004). Hemoglobin-Mediated Oxidation of Washed Minced Cod Muscle Phospholipids: Effect of pH and Hemoglobin Source. *J.Agric.Food Chem.*, 52(14), 4444-4451.
- Undeland, I., Hall, G., & Lingnert, H. (1999). Lipid oxidation in fillets of herring (*Clupea harengus*) during ice storage. *J.Agric.Food Chem.*, 47(2), 524-532.
- Vargas, K. M. (2001). Efecto de la vitamina C (L-ácido ascórbico) en el desarrollo de rancidez oxidativa en filetes de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) congelados. Tesis doctoral. Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C., & Serot, T. (2006). Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *J.Agric.Food Chem.*, 54(9), 3391-3401.
- Varlet, V., Prost, C., & Serot, T. (2007). Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chem.*, 105(4), 1536-1556.
- Venkateshwarlu, G., Let, M. B., Meyer, A. S., & Jacobsen, C. (2004). Chemical and Olfactometric Characterization of Volatile Flavor Compounds in a Fish Oil Enriched Milk Emulsion. *J.Agric.Food Chem.*, 52(2), 311-317.
- Vennat, B., Bos, M. A., Pourrat, A., & Bastide, P. (1994). Procyanidins from tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biol. Pharm. Bull.*, 17(12), 1613-1615.
- Vicetti, R., Ishitani, T., Salas, A., & Ayala, M. (2005). Use of alpha-tocopherol combined with synergists and compared to other antioxidants on the oxidative stability of sardine skin lipids. *J. Food Compos. Anal.*, 18(2-3), 131-137.

Vinson, J. A., Proch, J., & Bose, P. (2001). Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods Enzymol.* 335, 103-114.

Vinson, J. A., Jang, J., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., & Cai, S. (1995). Plant Polyphenols Exhibit Lipoprotein-Bound Antioxidant Activity Using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *J.Agric.Food Chem.*, 43(11), 2798-2799.

Vyncke, M. (1970). Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette Wiss Technol.*, 72(12), 1084-1087.

Wang, J., & Sporns, P. (1999). Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *J.Agric.Food Chem.*, 47(5), 2009-2015.

Wetterskog, D., & Undeland, I. (2004). Loss of redness (a*) as a tool to follow hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod mince. *J.Agric.Food Chem.*, 52(24), 7214-7221.

Wierda, R. L., Fletcher, G., Xu, L., & Dufour, J. (2006). Analysis of Volatile Compounds as Spoilage Indicators in Fresh King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) During Storage Using SPME-GC-MS. *J.Agric.Food Chem.*, 54(22), 8480-8490.

Wilkes, J. G., Conte, E. D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J. B., & Miller, D. W. (2000). Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 3-33.
Wood, N. T. (2002). Transcript profiling takes a stroll through the wood. *Trends Plant Sci.*, 7(3), 99.

Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J.Agric.Food Chem.*, 52(26), 7846-7856.

Xing, Y., & White, P. J. (1997). Identification and function of antioxidants from oat groats and hulls. *JAOCs.J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(3), 303-307.

Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., & Ariga, T. (1999). Free Radical Scavenging Activity of Grape Seed Extract and Antioxidants by Electron Spin Resonance Spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO System. *J.Agric.Food Chem.*, 47(7), 2544-2548.

Yamamoto, S. (1991). 'Enzymatic' lipid peroxidation: Reactions of mammalian lipoxygenases. *Free Radic. Biol. Med.*, 10(2), 149-159.

Zhang, (1997). Gas chromatography - Mass spectrometry analysis of volatile flavor compounds in mackerel for assessment of fish quality. *ACS symposium series*, 674, 55.



Capítulo 1: DESARROLLO ANALÍTICO

1.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN MÚSCULO DE PESCADO

1.1.1. Introducción

Como se ha mencionado en la introducción de esta memoria, el ácido ascórbico (AA) ejerce su función antioxidante mediante su oxidación a ácido dehidroascórbico (DHAA) (Fig. 14) y por ello es importante la determinación de ambas formas con el objeto de relacionar sus concentraciones con la oxidación lipídica. La determinación simultánea de AA y DHAA podría utilizarse como un método de seguimiento del deterioro oxidativo en músculo de pescado durante las etapas iniciales de almacenamiento o procesado, ya que, debido a su reducido potencial reductor, es consumido en los primeros estadios del proceso. Por otro lado, el análisis de los niveles AA es esencial para el estudio de los mecanismos de protección contra la oxidación lipídica y de las posibles interacciones con otros componentes presentes en el músculo o añadidos posteriormente. La aplicación de sistemas de detección selectivos y altamente sensibles es esencial para el análisis de la oxidación en matrices de productos marinos debido a los bajos niveles de este antioxidante endógeno que se encuentran en estadios avanzados, o para el estudio de las posibles interacciones con otros componentes, con el objetivo de elucidar mecanismos de protección sobre el músculo. Se han desarrollado numerosos métodos para el análisis de AA incluyendo colorimétricos (Carr, Bally, Thomas & Neff, 1983), espectrofotométricos (Dabrowski & Hinterleitner, 1989), potenciométricos (Esteve, Farré & Frígola, 1995), espectrofluorométricos (Waagbø, Glette, Raa-Nilsen & Sandnes, 1993) o cromatográficos. La determinación simultánea de AA y DHAA no resulta fácil, ya que el equilibrio puede ser fácilmente modificado durante su extracción de una matriz compleja como el músculo de pescado, debido a que el DHAA es muy inestable y es fácilmente hidrolizable de manera irreversible al ácido 2,3-dicetogulónico (Fig. 1.1).

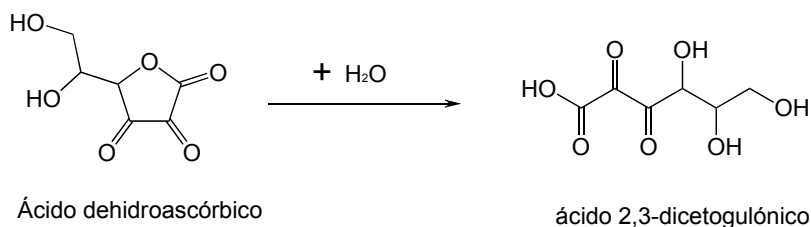


Figura 1.1: Formación del ácido 2,3-dicetogulónico.

Se han utilizado diversos disolventes ácidos para realizar la extracción de ambos analitos en un amplio espectro de matrices biológicas entre los que destacan el ácido cítrico, el ácido acético, el ácido perclórico o el ácido ortofosfórico. Lykkesfeldt, Loft & Poulsen (1995) demostraron que las disoluciones de AA/DHAA en una solución del 5 % de ácido metafosfórico en agua son estables durante dos meses a -20°C y por esta razón fue el disolvente utilizado en este trabajo.

El método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) es el método clásico de determinación de ácido ascórbico total, que es la suma de AA y DHAA. El AA es oxidado a DHAA y posteriormente se derivatiza con 2,4-DNPH dando lugar a la formación de un compuesto coloreado que es medido espectrofotométricamente. Este método presenta varios inconvenientes entre los que destaca su poca especificidad. Alternativamente, se han propuesto varios métodos basados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con distintos detectores. La determinación simultánea de ambos compuestos puede realizarse con un detector espectrofotométrico (Valls, Sancho, Fernández-Muiño, Alonso-Torre & Checa, 2002), cuyo mayor inconveniente es la baja sensibilidad debida a la pobre absorción del DHAA. Kacem, Marshall, Matthews & Gregory (1986) trataron de incrementar esa absorptividad con la derivatización precolumna del DHAA con 1,2-fenilendiamina (OPDA) pero los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios. La utilización de un detector electroquímico resuelve los problemas de sensibilidad y especificidad pero no permite la determinación simultánea de AA y DHAA ya que la forma oxidada de la vitamina C es electroquímicamente inactiva. Iwase & Ono (1993) determinaron la cantidad total de AA en muestras de zumos utilizando L-cisteína para reducir el DHAA. La cantidad de AA fue determinada con el mismo procedimiento pero con omisión de la etapa de reducción. Por último, han sido publicados varios trabajos en los que la determinación de ambos analitos se ha llevado a cabo mediante la separación con HPLC y el análisis con detector de fluorescencia. La conversión de los analitos a un compuesto fluorescente mediante derivatización es un paso previo imprescindible. La formación del derivado fluorescente 3- (1,2-dihidroxietil)furo[3,4-b]quinoxalina-1-ona tras la reacción del DHAA con la o-fenilendiamina (OPDA) es el método más descrito en la bibliografía (Fig. 1.2).

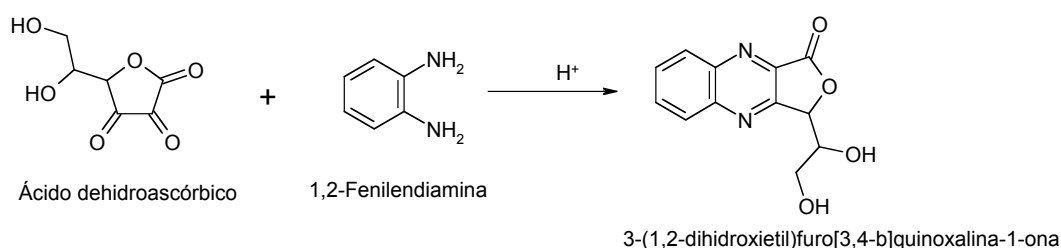


Figura 1.2: Reacción de derivatización del ácido ascórbico con OPDA.

Para llevar a cabo esta determinación, es necesaria la oxidación previa del AA a DHAA. En la bibliografía se ha descrito una gran variedad de agentes de oxidación, tanto enzimáticos como químicos. Speek, Schrijver & Schreurs (1984) utilizaron ascórbico oxidasa para la determinación de ambas formas en muestras de alimentos y bebidas. Kmetec (1992) utilizó N-Bromosuccinimida en muestras de medicamentos. El bromo también ha sido utilizado como agente oxidante en muestras de productos lácteos (Bilic, 1991) y el yodo para muestras de suero humano (Iwata, Yamaguchi & Hara, 1985) o de distintos alimentos (Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998). También se utilizó carbono activo para el análisis en gónada de erizo de mar (Rodríguez-Bernaldo de Quirós, López-Hernández & Simal-Lozano, 2001) o en muestras de alimentos (Bognár & Daood, 2000). Por último, el cloruro de mercurio se ha utilizado en la determinación AA en alimentos (Vanderslice & Higgs, 1984).

En relación al derivatizante, aunque la OPDA es el más empleado para la determinación de AA y su forma oxidada, no es el único ya que se han empleado otros compuestos para la conversión del DHAA en una sustancia fluorescente. Además de la 2,3-diaminopiridina (Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998), los más utilizados son derivados de la OPDA que dan lugar a compuestos similares a los obtenidos en la reacción de condensación de la Fig. 1.2: la 4-metoxi- y la 4-etoxi-*o*-fenilendiamina (Bilic, 1991), la 4-metil- y la 4,5-dimetil-*o*-fenilendiamina (Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998) y por último 4,5-dimetoxi-*o*-fenilendiamina (Iwata, Yamaguchi & Hara, 1985, Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998). La 2,3-diaminopiridina también ha sido utilizada como derivatizante (Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998).

En este capítulo de la memoria se describe la metodología llevada a cabo para la optimización de un método de determinación simultánea de AA y DHAA en músculo de pescado. El método se aplicó a muestras reales, estudiándose la concentración de ambos compuestos en distintas especies.

1.1.2. Experimental

1.1.2.1. Materiales e Instrumentación

1. *Pescado*

Para la realización de los experimentos se emplearon cinco especies diferentes de pescado adquiridas en un mercado local de Vigo, las cuales presentaron una calidad *extra* de frescura (DOCE, 1989): Caballa (*Scomber scombrus*), Faneca (*Trisopterus luscus*), Jurel (*Trachurus trachurus*), Lirio (*Micromesistius poutassou*) y Pescadilla (*Merluccius merluccius*).

2. *Disolventes, reactivos y gases*

- 1,2-Fenilendiamina (Merck®, Darmstadt, Alemania)
- 4,5-Dimetil-1,2-fenilendiamina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Ácido Clorhídrico 37 % (Prolabo, Madrid)
- Ácido Metafosfórico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Ácido Sulfúrico 95 % (Prolabo, Madrid)
- Ácido α -cetovaleérico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Agua Milli-Q ultrapura
- Carbonato Sódico (Prolabo, Madrid)
- Etanol 95 % (Prolabo, Madrid)
- Hexano (Prolabo, Madrid)
- Ioduro potásico (BHD, Poole, Inglaterra)
- Isobutanol (Merck®, Darmstadt, Alemania)
- Metanol, pureza de cromatografía líquida (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Sulfato sódico anhidro para análisis 99 % (Prolabo, Madrid)
- Tiosulfato sódico (BDH, Poole, Inglaterra)
- Yodo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Yoduro potásico (Fluka, New-Ulm, Suiza)

3. *Patrones*

Tanto el AA como el DHAA fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

4. Materiales e instrumentación

- Balanza de precisión (Sartorius)
- Centrífuga, GS 6R (Beckman)
- Espectrofotómetro Beckman modelo DU 640
- Material de vidrio de uso común en el laboratorio
- Medidor de pH (Beckman).
- Pipetas (Eppendorf).
- Trituradora Kitchen Aid (Kitchen Aid Inc., MI, USA)
- Ultra Turrax T-25 (Ika®)
- Vor Tech (Heidolph).
- Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
 - Sistema con dos bombas Beckman, modelo System Gold, con programador de gradientes.
 - Inyector manual Rheodyne, modelo 7725i, con un bucle externo de 20 μ L.
 - Detector de matriz de fotodiodos (DAD), Beckman System Gold module 168.
 - Detector de fluorescencia Termo Finnigan modelo FL3000 equipado con una lámpara de xenon.

1.1.2.2. Preparación de disoluciones

1. Disoluciones patrón AA y DHAA

Los patrones de AA y DHAA se prepararon diluyendo con ácido metafosfórico al 4,5 % una disolución madre de concentración 100 μ g/mL preparada en el mismo disolvente.

2. Reactivos para oxidación

Disolución de yodo: Se preparó una disolución de 0,05 mol/L. Para ello 1,3 gramos de yodo (I_2) se disolvieron en yoduro potásico (KI) al 40 % y se añadieron 0,1 mL de una disolución de HCl (7 mol/L). Esta disolución fue diluida con agua milli-Q hasta un volumen final de 100 mL.

Disolución de tiosulfato sódico: Se preparó una disolución de 0,1 mol/L. Para ello 2,5 g de tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3$) y 0,02 g de carbonato sódico (Na_2CO_3) fueron disueltos en 100 ml de agua milli-Q.

Ambas disoluciones se conservaron a 4 °C y se diluyeron a 0,005 y a 0,01 mol/L respectivamente antes de su utilización.

3. Agentes derivatizantes:

Para este experimento se ensayaron dos agentes derivatizantes, la 1,2-fenilendiamina (OPDA) y la dimetil-*o*-fenilendiamina (DMPD). Las concentraciones de ambas disoluciones fueron de 1000 ppm. La solución de OPDA se preparó disolviendo 10 mg en 10 mL de una disolución 0,005 mol/L de ácido sulfúrico (H₂SO₄). En el caso de la solución de DMPD, se disolvieron 10 mg en 1 mL de etanol y se añadieron 9 mL de la disolución de H₂SO₄.

1.1.2.3. Metodologías

1. Extracción del AA y del DHAA del músculo de pescado.

La extracción de AA y de DHAA del músculo de pescado, es un proceso delicado debido a la poca estabilidad del equilibrio AA/DHAA. El músculo blanco se separó de la piel y del músculo rojo, se picó en una trituradora y se mantuvo refrigerado durante la preparación de los extractos. Los analitos se extrajeron a partir de 3 gramos de músculo picado con 8 mL de una disolución de ácido metafosfórico al 4,5 %, homogeneizando la mezcla con un Ultra-Turrax durante 2 minutos a 9000 rpm. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para separar la fase acuosa del músculo y finalmente dos alícuotas del sobrenadante, de 3 mL cada una, fueron retiradas de cada tubo para el análisis de AA y de DHAA respectivamente.

2. Análisis del AA y del DHAA contenidos en el extracto.

El método de oxidación de AA en el extracto es una modificación del procedimiento descrito por Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi (1998). A una alícuota de 3 mL del extracto de músculo de pescado se le añadieron 300 µL de la disolución de I₂ 0,005 mol/L para la formación de DHAA. A continuación se añadieron 300 µL de Na₂S₂O₃ 0,01 mol/L para descomponer el exceso de yodo. Por último se ajustó el pH de la disolución con hidróxido sódico (NaOH) de concentración 1 mol/L, antes de la derivatización. Para el análisis de DHAA se siguió el mismo procedimiento con la otra alícuota, sin la adición de I₂ ni Na₂S₂O₃.

3. Derivatización.

El procedimiento empleado para la derivatización de DHAA consistió en una modificación del método descrito por Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi (1998). El DHAA del extracto de músculo de pescado se trató con 300 µL de la disolución del agente derivatizante. La disolución se dejó durante media hora protegida de la luz y a temperatura ambiente para que se completara la reacción de condensación.

4. Reextracción con isobutanol.

El extracto derivatizado se sometió a una extracción líquido-líquido con isobutanol para poder concentrar el DHAA derivatizado formado y separarlo de posibles interferencias contenidas en la disolución acuosa. Para ello, los 3 mL de extracto se agitaron durante 2 minutos con 1 mL de isobutanol. A continuación se centrifugó la mezcla durante 2 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se secó con sulfato sódico anhidro y se inyectaron 20 µL de este extracto en el equipo HPLC para su análisis.

5. Determinación analítica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El análisis del derivado de DHAA se llevó a cabo mediante un sistema de HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. En la Tabla 1.1 se resumen las condiciones utilizadas.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Tipo de columna	Waters Symmetry® Cartridge C18 de 250 mm x 4,6 mm D.I., con tamaño de partícula de 5 µm
Flujo	1 mL/min
Elución	Isocrática
Fase móvil	MeOH:0,1 % metafosfórico (1:1)
Detección	Fluorescencia

Tabla 1.1: Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de AA y DHAA.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión del detector de fluorescencia fueron, respectivamente, 350 y 422 nm para el derivado de OPDA y 362 y 444 nm para el derivado de DMPD.

1.1.3. Resultados y discusión

1.1.3.1. Optimización del método

1. Comparación de agentes derivatizantes.

Las cantidades de AA y DHAA en el músculo de pescado *post mortem* pueden variar rápidamente durante el almacenamiento o el procesado debido a la pérdida secuencial de los mismos con el paso del tiempo (Brannan & Erickson, 1996). Es necesario que el método empleado sea lo suficientemente sensible para su determinación en períodos avanzados de almacenamiento del músculo. En este trabajo se estudió la eficacia, desde el punto de vista de la sensibilidad, de dos derivatizantes del DHAA: la OPDA y la DMPD. En las Fig. 1.3 y 1.4 se muestra una comparativa de los cromatogramas obtenidos de un patrón de AA de aproximadamente 5 µg/mL tras la oxidación y derivatización y un patrón de DHAA de aproximadamente 3 µg/mL tras la derivatización con ambos agentes.

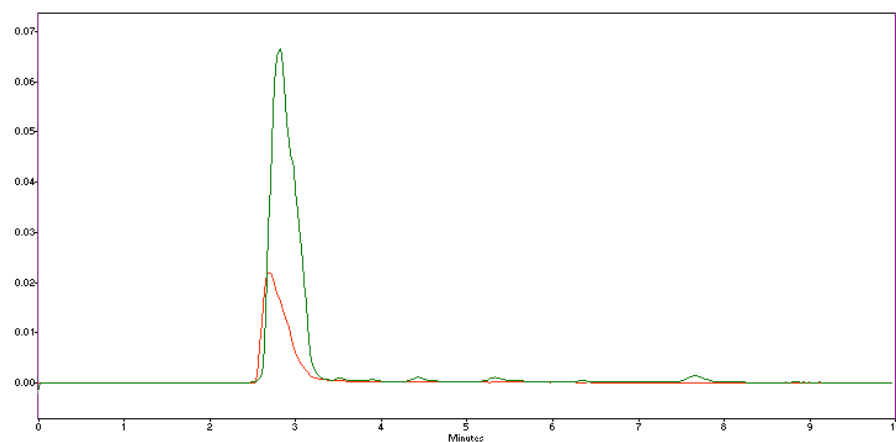


Figura 1.3: Cromatograma obtenido de la derivatización de AA con OPDA (rojo) y DMPD (verde).

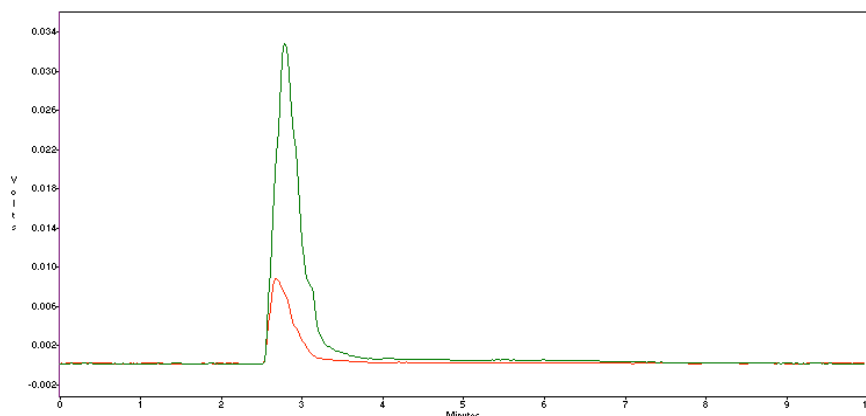


Figura 1.4: Cromatograma obtenido de la derivatización de DHAA con OPDA (rojo) y DMPD (verde).

Los cromatogramas muestran que los derivados de DMPD presentan una intensidad fluorescente mayor que los derivados de OPDA (las áreas obtenidas tras el análisis del patrón de AA fueron de $2,4 \times 10^6$ y $0,4 \times 10^6$ unidades respectivamente). Además del incremento de sensibilidad, el DMPD es un agente altamente específico para el DHAA mientras que el OPDA puede reaccionar con otro tipo de compuestos que podrían interferir en el análisis (Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi, 1998). Iwata, Yamaguchi & Hara (1985) han sugerido algunos compuestos con un grupo funcional 1,2-diceto, entre los que se encuentran algunos tipos de aminas, aminoácidos, esteroides o vitaminas, los cuales podrían reaccionar con el DMPD y mostrar fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión similares a las utilizadas para el análisis del derivado de DHAA. A modo de ejemplo, se utilizó el ácido- α -cetovalérico para comprobar una posible interferencia en el análisis, a pesar de que este compuesto no ha sido detectado en músculo de pescado. Para ello, se derivatizó y analizó una mezcla acuosa de DHAA y el dicetoácido, cuyo cromatograma se muestra en la Fig. 1.5.

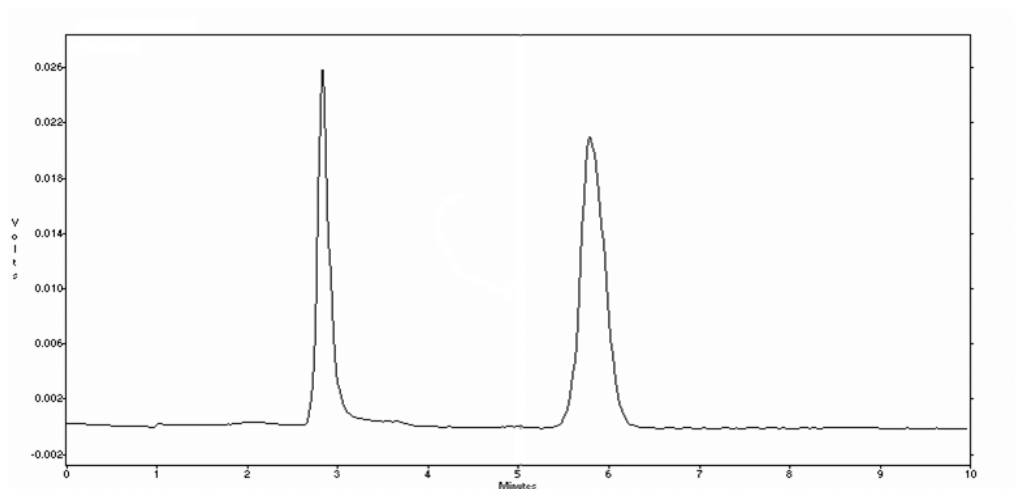


Figura 1.5: Cromatograma de una mezcla de DHAA y ácido- α -cetovalérico derivatizados.

En las condiciones de reacción utilizadas, ambos compuestos se derivatizan y son detectados mediante fluorescencia a las longitudes de onda seleccionadas, pero aparecen bien resueltos cromatográficamente por lo que el cetoácido no interferiría en el análisis.

2. *Influencia del pH.*

El pH de la disolución en la que se lleva a cabo la derivatización es un factor importante en el rendimiento de la reacción (Zapata & Dufour, 1992). Por ello, se realizó un estudio de la influencia de este factor mediante el ajuste del pH de la disolución con distintas cantidades de HCl y NaOH (Fig. 1.6).

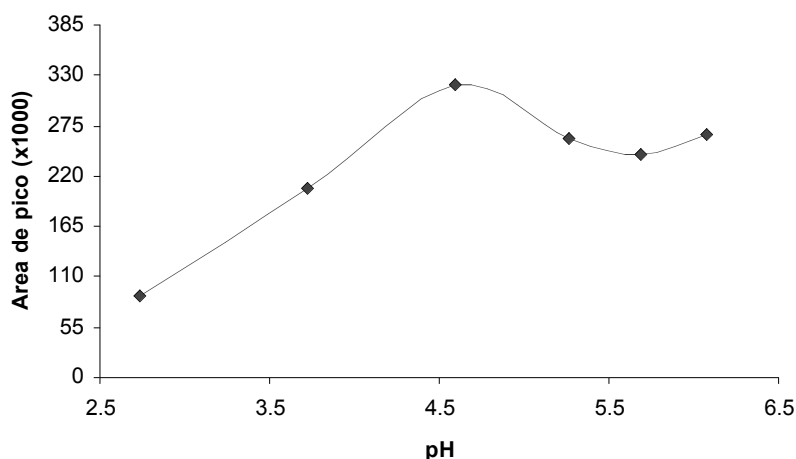


Figura 1.6: Optimización del pH de la reacción de derivatización. La concentración de AA fue de 5 µg/mL.

La Fig. 1.6 muestra un aumento progresivo del área de pico entre los valores de pH 2,5 y 4,6 donde se produjo un ligero descenso. La señal se estabilizó a un valor de pH de aproximadamente 5,5. El valor 5,7, que se corresponde con una adición de 600 µL de NaOH de concentración 1 mol/L, fue seleccionado como el óptimo. La figura muestra que éste no es el pH al que se obtiene la mayor sensibilidad pero es una zona con poca dependencia del mismo. Este aspecto podría ser importante, desde el punto de vista de la reproducibilidad del análisis, en los casos en que las muestras contengan sustancias con propiedades ácido-base que modifiquen ligeramente el pH del extracto acuoso.

3. Reextracción con disolvente orgánico.

Mori, Kidawara, Iseki, Umegaki & Kishi (1998) estudiaron la eficacia de diferentes disolventes para la extracción del compuesto derivatizado con el objetivo de incrementar la sensibilidad y especificidad del método. La Fig. 1.7 muestra el cromatograma obtenido tras el análisis de una disolución acuosa del derivado de DHAA y de la fase orgánica tras ser sometida ésta a una extracción líquido-líquido con 1 mL de isobutanol. Además de la reducción significativa de los límites de detección, se observó también una mejora considerable en la forma del pico cromatográfico.

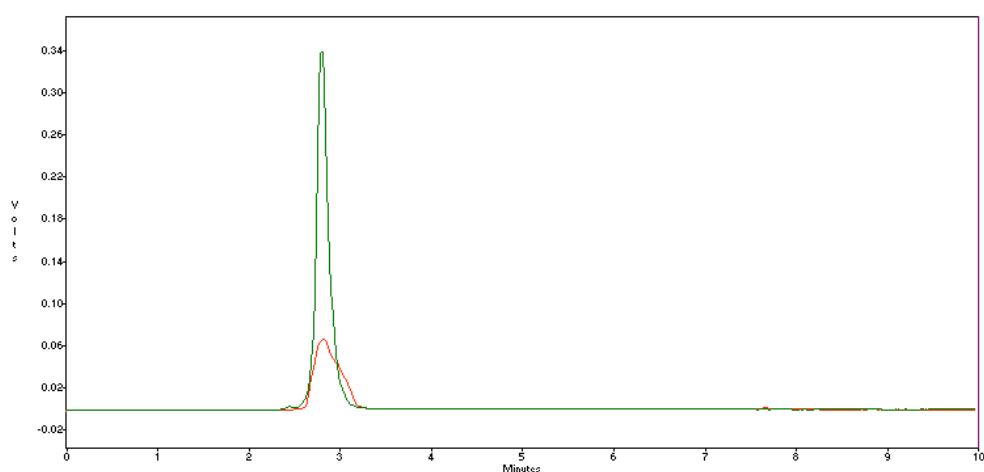


Figura 1.7: Cromatogramas obtenidos de un derivado de DHAA con (verde) y sin (rojo) extracción con isobutanol.

1.1.3.2. Validación

La validación del método se llevó a cabo utilizando el método optimizado en las condiciones que se describen a continuación: tras la extracción de los analitos del músculo, y la oxidación con yodo para la determinación de AA, se procedió a la derivatización con DMPD a pH 5,7 (añadiendo 600 μ L de NaOH 1 M) y por último se llevó a cabo un proceso de limpieza y concentración del extracto acuoso mediante extracción líquido-líquido con 1 mL de isobutanol. La Fig. 1.8 muestra el cromatograma obtenido de un extracto de jurel en las condiciones anteriormente descritas. El pico a 2,8 minutos es el identificado como el derivado de DHAA y como se observa, está perfectamente separado de los otros componentes de la matriz.

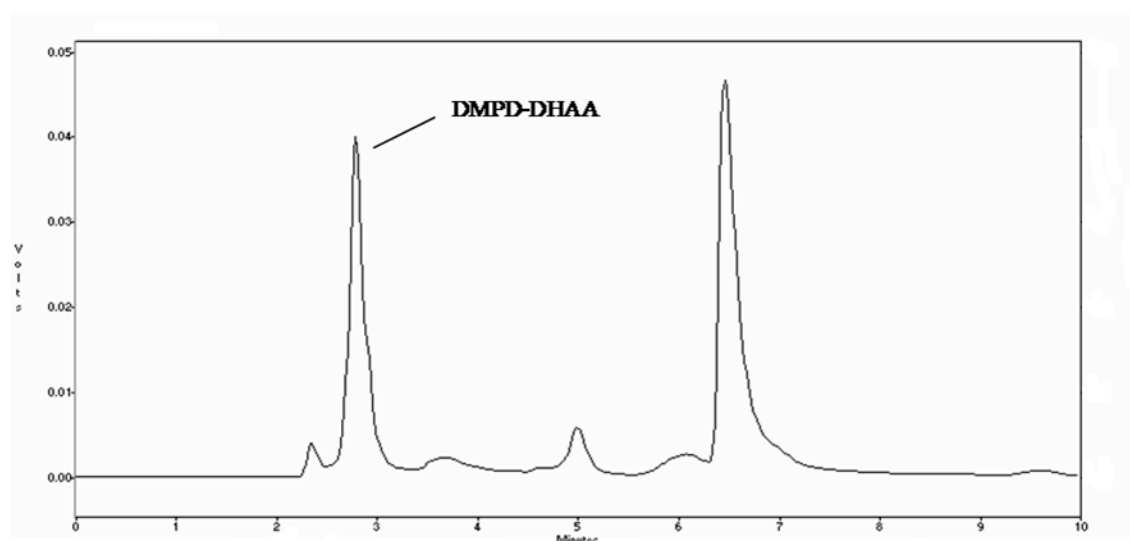


Figura 1.8: Cromatograma obtenido de un extracto de pescado tras oxidación del AA y posterior derivatización con DMPD.

1. Linealidad.

Con objeto de estudiar la existencia de efecto matriz en el análisis de muestras de músculo de pescado, se compararon las rectas de calibrado obtenidas mediante los métodos de adiciones standard y patrón externo. Se inyectaron cinco patrones en el rango comprendido entre 1 y 6 $\mu\text{g/mL}$ para AA y de entre 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ para DHAA preparados en ácido metafosfórico al 4,5 %. Para el método de adiciones standard los patrones se adicionaron sobre un extracto de músculo de jurel. Las pendientes observadas para ambas rectas de calibrado (Fig. 1.9) fueron muy similares en el rango de concentraciones indicado (201829 y 254592 unidades respectivamente). Por lo tanto, se decidió utilizar la calibración con patrón externo.

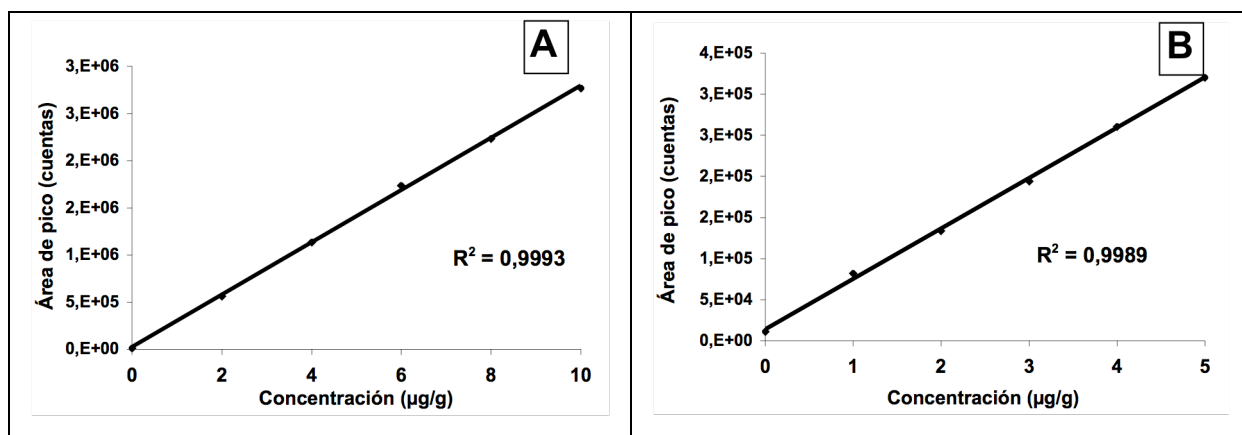


Figura 1.9: Rectas de calibrado obtenidas con el método del patrón externo para AA (A) y para DHAA (B).

2. Límites de detección

Se define límite de detección como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”. Se puede demostrar que se puede obtener a partir de la siguiente fórmula (Skoog, Holler & Nieman, 2000):

$$X_{LD} = 3S_x / b$$

Siendo S_x la desviación estándar estimada de los errores de las respuestas y b la pendiente de la recta.

Los límites de detección del método descrito en este trabajo fueron calculados de acuerdo con este procedimiento y correspondieron a concentraciones **0,26 µg/g** para AA y **0,59 µg/g** para el DHAA a una relación señal/ruido de 3.

3. Recuperaciones.

Las recuperaciones se evaluaron tras la adición de patrones de AA y DHAA sobre extractos de músculo de pescado de jurel y caballa a concentraciones de 2 µg/g tanto de AA como de su forma oxidada. Los resultados obtenidos tras el análisis del extracto con adición fueron corregidos con los obtenidos tras el análisis sin adición. Las recuperaciones resultaron cuantitativas tanto para AA como para DHAA (Tabla 1.2).

	<i>Recuperaciones AA (%)</i>	<i>Recuperaciones DHAA (%)</i>
Jurel	93,0 ± 8,6	99,1 ± 9,5
Caballa	92,4 ± 1,3	98,4 ± 4,1

Tabla 1.2: Recuperaciones (%) obtenidas de AA y DHAA en músculo de pescado. Media ± desviación standard.

4. *Precisión*

La **reproducibilidad** del método cromatográfico fue satisfactoria en términos de tiempo de retención. Las variaciones encontradas en repeticiones diarias de pinchazos de patrones fueron de un 1,5 % en un período de un mes, con unas fluctuaciones de la temperatura del laboratorio de aproximadamente ± 5 °C.

Para evaluar la **repetibilidad** del proceso completo se analizaron una serie de seis alícuotas de músculo blanco mezclado y picado de jurel. Los coeficientes de variación encontrados fueron de 2,31 y 3,58 % para AA y DHAA respectivamente, valores que se consideraron muy satisfactorios.

1.1.3.3. **Aplicación a muestras reales**

El método optimizado fue utilizado para evaluar el contenido de AA y DHAA, en músculo blanco de distintas especies de pescado con diferente contenido en grasa. El objetivo fue encontrar una posible relación entre las concentraciones y el contenido de grasa presente en el músculo. La Tabla 1.3 muestra los resultados obtenidos.

	<i>AA (µg/g)</i>	<i>DHAA (µg/g)</i>	<i>Ascórbico total (µg/g)</i>
Faneca	2,88 ± 0,03	0,34 ± 0,03	3,12 ± 0,00
Lirio	10,63 ± 0,57	2,19 ± 0,13	12,82 ± 0,70
Pescadilla	2,51 ± 0,16	0,16 ± 0,04	2,67 ± 0,13
Caballa	1,32 ± 0,77	6,18 ± 0,75	7,50 ± 0,02
Jurel	1,13 ± 0,16	1,36 ± 0,34	2,49 ± 0,18

Tabla 1.3: Contenidos de AA y DHAA en el músculo blanco de varias especies de pescado.

El contenido de Ascórbico total (suma de AA y DHAA) fue significativamente diferente entre las distintas especies y no pareció seguir un patrón. Sin embargo, los niveles de DHAA siguieron el orden caballa > lirio > jurel > faneca ≥ pescadilla que es acorde con el orden de cantidad de grasa de las distintas especies. Los valores de la relación de concentraciones AA/DHAA (Tabla 1.4) demuestran que el AA es la forma predominante en especies magras mientras que en las especies grasas los niveles de DHAA son similares o incluso mayores que su forma reducida.

	<i>Relación AA/DHAA</i>
Faneca	8,5 ± 0,8
Lirio	4,8 ± 0,0
Pescadilla	16,4 ± 4,8
Caballa	0,2 ± 0,1
Jurel	0,9 ± 0,3

Tabla 1.4: Relaciones AA/DHAA encontradas en las distintas especies de pescado analizadas.

El orden en la relación AA/DHAA es caballa < jurel < lirio < faneca < pescadilla, que se correlaciona de forma inversa con el contenido graso. Estos resultados sugieren que la oxidación del AA contenido en el músculo post-mortem de pescado es mucho mayor en las especies grasas que en las especies magras, es decir, en aquellas con mayor sustrato de la oxidación. El AA previene la oxidación de los PUFAs y del α-Tocoferol consumiéndose de manera más rápida cuanto mayor es la susceptibilidad del músculo a la oxidación lipídica. La degradación de este antioxidante endógeno se produce mediante su oxidación a DHAA que es finalmente

hidrolizado de manera irreversible a ácido 2,3-dicetogulónico (Krishnamoorthy & Narasimhan, 1972).

Krishnamoorthy & Narasimhan (1972) también relacionaron las cantidades relativas de AA y de DHAA con la oxidación lipídica en músculo de pescado. Este estudio mostró las diferentes relaciones AA/DHAA encontradas entre el músculo rojo y el músculo blanco en una misma especie de pescado. Los autores no encontraron diferencias en cuanto a la cantidad de ácido ascórbico total pero sí variaciones en la relación AA/DHAA en ambos tipos de músculo. Los niveles de AA encontrados en el músculo blanco resultaron unas 2,5 veces mayores que en el músculo rojo mientras que en éste, los niveles de DHAA fueron unas 13 veces mayores. Los autores concluyeron que estos valores reflejaron el distinto metabolismo de la vitamina C en ambos tipos de músculo debido a la mayor cantidad de Hb y metales en el músculo rojo, que actúan como potenciales catalizadores de la reacción de oxidación lipídica.

En frutas y vegetales, la relación AA/DHAA ha sido asociada al pH. Gökmen, Kahraman, Demir & Acar (2000) encontraron que el DHAA es la forma predominante en vegetales que muestran un pH > 5. Por el contrario, en el caso de las frutas, el AA es la especie mayoritaria y el pH de éstas es siempre menor de 4. En el pescado, estas variaciones no parecen ser debidas al pH ya que aunque sí se observan diferencias en las cantidades de AA y DHAA, el pH no suele variar entre especies encontrándose en todos los casos valores entre 5,5 y 7 unidades aproximadamente.

1.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PROCEDENTES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN EMULSIONES ENRIQUECIDAS EN ACEITE DE PESCADO

1.2.1. Introducción

El alto contenido de ácidos grasos ω -3 en los aceites de pescado ha provocado que en los últimos años se hayan realizado importantes esfuerzos con el objetivo de incorporarlos a diferentes alimentos como yogures (Jafar, Hultin, Bimbo, Crowther & Barlow, 1994), ensaladas (Schnepf, Spencer & Carlat, 1991), mayonesas (Hsieh & Regenstein, 1991) o pan (Nielsen, 1992). Además de las ventajas adquiridas desde el punto de vista funcional, la incorporación de estos aceites aumenta su susceptibilidad a procesos de oxidación lipídica y, como consecuencia, a la formación de los volátiles responsables de los olores y sabores desagradables asociados a la rancidez. La determinación analítica de estos compuestos presenta diversas aplicaciones entre las que destacan el seguimiento de oxidación lipídica como método alternativo a los clásicos PV o TBARS, o la elucidación de los mecanismos mediante los que se lleva a cabo su formación, permitiendo el diseño de estrategias de retardo del deterioro lipídico. Debido a la volatilidad de estos compuestos, los métodos más utilizados para su análisis conllevan la determinación analítica mediante GC. Como se ha descrito previamente, entre los métodos de extracción de la matriz destacan la destilación/extracción simultánea, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) o los métodos de espacio de cabeza tanto estático (SHS) como dinámico (DHS) (Jónsdóttir, Bragadóttir & Arnarson, 2005, King, Hamilton, Mathews, Rule & Field, 1993, Yang & Peppard, 1994). Los métodos de espacio de cabeza presentan la ventaja de que son selectivos para compuestos con bajos puntos de ebullición, siendo los más utilizados para la determinación de volátiles en aceites de pescado o emulsiones enriquecidas en aceite de pescado (Hartvigsen, Lund, Hansen & Holmer, 2000, Let, Jacobsen & Meyer, 2004, Venkateshwarlu, Let, Meyer & Jacobsen, 2004). La extracción de los analitos contenidos en el espacio de cabeza de la muestra mediante microextracción en fase sólida (HS-SPME) presenta varias ventajas con respecto a la utilización de las técnicas de extracción anteriormente expuestas. Es sensible, selectiva, rápida, barata, no precisa la manipulación de disolventes orgánicos y es fácilmente automatizable. Esta técnica se ha utilizado para la determinación de volátiles asociados al aroma en distintas muestras de alimentos como aceites (Cavalli, Fernández, Lizzani-Cuvelier & Loiseau, 2004, Vichi, Castellote, Pizzale, Conte, Buxaderas & López-Tamames, 2003), músculo de pescado (Duflos,

Moine, Coin & Malle, 2005, Guillén & Errecalde, 2002), jamón (Brunton, Cronin, Monahan & Durcan, 2000), patata (Sanches-Silva, Rodríguez-Bernaldo De Quirós, López-Hernández & Paseiro-Losada, 2004) o tomate (Song, Fan & Beaudry, 1998). En la literatura se encuentran muy pocas aplicaciones de la SPME para la detección de volátiles en emulsiones (Beltrán, Aguilera & Gordon, 2005, Fabre, Aubry & Guichard, 2002, Mirhosseini, Salmah, Nazimah & Tan, 2007).

En este capítulo se expone el estudio llevado a cabo para la optimización de un método de determinación de volátiles derivados de la oxidación lipídica mediante HS-SPME y GC-MS en emulsiones de aceite de pescado en agua, y se evaluó su aplicabilidad para el seguimiento de la oxidación en distintos alimentos emulsionados enriquecidos en aceite de pescado. Debido a que las emulsiones de aceite de pescado en agua constituyen un excelente modelo para predecir el comportamiento de aditivos antioxidantes en músculo de pescado (Pazos, Gallardo, Torres & Medina, 2005), el método desarrollado fue posteriormente utilizado para llevar a cabo estudios sobre la eficacia de los aditivos ensayados y los mecanismos que rigen su actividad (Capítulo 2).

1.2.2. Experimental

1.2.2.1. Materiales e Instrumentación

1. *Disolventes, reactivos y gases*

- 3-Metil-3-buten-1-ol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Aceite de hígado de bacalao (*Gadus morhua*) (Fluka, New-Ulm, Suíza)
- Agua Milli-Q ultrapura.
- Etanol 95 % (Prolabo, Madrid).
- Helio, Pureza $\geq 99,9999$ % (Air Liquide)
- Lecitina de soja con un 40 % de L- α -fosfatidilcolina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)
- Sulfato sódico anhidro para análisis 99 % (Prolabo, Madrid).
- Tiosulfato sódico (BDH, Poole, Inglaterra).

2. *Patrones*

(E,E)-2,4-heptadienal, 1-penten-3-ona, 2-etilfurano, 2-pentilfurano, acetaldehído, butanal, E-2-heptenal, E-2-hexenal, E-2-pentenal, heptanal, hexanal, octano, pentanal, pentano, propanal y Z-4-heptenal fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El patrón de ácidos grasos FAME Mix fue adquirido a Supelco (Bellefonte, PA, USA).

3. *Material e instrumentación*

- Centrífuga, GS 6R (Beckman).
- Material de vidrio de uso común en el laboratorio.
- Medidor de pH (Beckman).
- Pipetas (Eppendorf).
- Ultra Turrax T-25 (Ika®).
- Vor Tech (Heidolph).
- Fibras de SPME: Para la optimización del método se ensayaron tres recubrimientos: 75 μm de Carboxen-polidimetilsiloxano (**CAR-PDMS**), 65 μm de Polidimetilsiloxano-divinilbenceno (**PDMS-DVB**) and 65 μm de Carbowax-divinilbenceno (**CW-DVB**) adquiridas a Supelco (Bellefonte, Palo Alto, California, USA).

- Espectrofotómetro Beckman, modelo DU 640 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, USA).
- Equipo de Cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) para la determinación de ácidos grasos.
 - o Cromatógrafo de gases PerkinElmer Clarus 500 (PerkinElmer, Willemsley, MA, USA) equipado con un inyector de vaporización de temperatura programada (PTV) y un detector de ionización de llama (FID).
 - o Columna cromatográfica SP-2330 (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, California, USA) con unas medidas de 30 m x 0,25 mm x 0,20 μ m.
- Equipo de Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS)
 - o Cromatógrafo de gases Thermo Finnigan ThermoQuest (San Jose, California) equipado con un inyector split/splitless.
 - o Columna cromatográfica DB-1701 (Folsom, California) con unas medidas de 30 m x 0.32 mm x 1 μ m.
 - o Espectrómetro de Masas Trace (Thermo Finnigan ThermoQuest, San Jose, CA) equipado con un cuadrupolo.

Las condiciones cromatográficas son resumidas en la Tabla 1.5.

<i>GC Thermo Finnigan</i>		<i>Trace MS Finnigan</i>	
Inyector	Split/Splitless	Temperatura interfase	265°C
Modo de inyección	Split	Temperatura fuente	200°C
Temperatura	300°C	Voltaje del Electromultiplicador	500 V
Flujo	1,5 mL/min	Velocidad de barrido	0,220 s/scan
Flujo de split	45 mL/min	Modo ionización	Impacto electrónico
Columna	DB-1701	Energía de ionización	70 eV
Fase	(14 %-Cianopropil-fenil)-metilpolisiloxano	Corriente de emisión	150 µA
Dimensiones	30 m x 0.32 mm x 1 µm	Modo de Adquisición	Full scan
Gas portador	Helio	Intervalo de masas	10-190 m/z
Programa de temperaturas			
Temperatura inicial	35°C (3 min)		
Rampa 1	3°C/min (hasta 70°C)		
Rampa 2	10°C/min (hasta 200°C)		
Rampa 3	20°C/min (hasta 260°C)		
Temperatura final	260 °C (5 min)		

Tabla 1.5: Condiciones instrumentales utilizadas para la determinación de volátiles en emulsiones.

1.2.2.2. Metodologías

1. Preparación de emulsiones de aceite en agua.

La preparación de las emulsiones de aceite en agua empleadas para la optimización del método, se llevó a cabo mediante adaptación del procedimiento descrito por Huang, Frankel & German (1994). Se prepararon emulsiones con un 10 % de aceite (p/p). Para ello, se disolvió lecitina (1 %) en un vaso de precipitados que contenía aceite de hígado de bacalao. A continuación se añadió el agua gota a gota sobre la disolución, homogeneizando con ayuda del homogeneizador-triturador UltraTurrax. En todo este proceso, la emulsión se mantuvo en un baño de agua-hielo para preservarla del posible calentamiento generado por el homogeneizador y, finalmente, se filtró a vacío para eliminar las gotas de aceite no emulsificadas.

2. Preparación de muestras reales enriquecidas en aceite de pescado

Para la aplicación del método optimizado se enriquecieron muestras de leche desnatada y mayonesa de aceite vegetal adquiridas en un mercado local. Las muestras fueron enriquecidas en el laboratorio añadiendo lentamente aceite de hígado de bacalao (5 % en leche y 16 % en mayonesa) y homogeneizando continuamente con un Ultra Turrax para la completa emulsificación del aceite.

3. Oxidación de las emulsiones de aceite en agua

Las emulsiones de aceite en agua, utilizadas para la optimización del método, fueron sometidas a una oxidación rápida con el objetivo de generar los compuestos volátiles monitorizados en la optimización. Para ello, se introdujeron en matraces Erlenmeyer y se incubaron en un horno a 50°C durante 24 horas. La oxidación fue comprobada mediante la detección sensorial de los olores característicos de la rancidez oxidativa.

4. Oxidación de leche y mayonesa enriquecidas en aceite de pescado

Las muestras reales enriquecidas fueron sometidas a una oxidación lenta para el seguimiento periódico del deterioro oxidativo. Para ello, 100 g de leche enriquecida y 100 g de mayonesa fueron introducidos en matraces erlenmeyer de 250 mL, y se almacenaron bajo las siguientes condiciones: la leche a 30°C durante 4 días y la mayonesa a 40 °C durante 17 días. El desarrollo de la oxidación fue monitorizado mediante el análisis sensorial y la formación de dienos y trienos conjugados. Los periodos de inducción fueron calculados como el tiempo transcurrido hasta la observación de un cambio brusco en la cinética de oxidación, mediante el método de las tangentes a las dos partes de la curva cinética (Frankel, 1998).

5. Optimización conjunta de cantidad de muestra, temperatura y tiempo de extracción y agitación. Diseño experimental

La influencia de distintos parámetros en el rendimiento de la HS-SPME fue estudiada mediante un diseño experimental. Se seleccionó un diseño factorial completo a dos niveles (2⁴) dividido en cuatro bloques (los experimentos se realizaron en cuatro días) con dos puntos centrales por bloque. Con la adición de los puntos centrales se consiguieron los suficientes grados de libertad para evaluar la posible influencia del factor bloque. El número final de experimentos

fue 24 y el orden en el que se llevaron a cabo fue aleatorio. La respuesta evaluada fue el área de pico de cada uno de los analitos. Los experimentos se realizaron con la fibra CAR-PDMS previamente seleccionada, desorbiendo la misma durante 10 minutos con el inyector a 300°C y los resultados fueron analizados utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1. Los factores y sus niveles se indican en la Tabla 1.6.

<i>Clave</i>	<i>Factor</i>	<i>Nivel bajo</i>	<i>Nivel alto</i>
Factor A	Temperatura de extracción (°C)	40	60
Factor B	Tiempo de extracción (min.)	10	30
Factor C	Cantidad de muestra (g)	1	6
Factor D	Agitación	Sin agitación	Con agitación

Tabla 1.6: Codificación y niveles de los factores seleccionados para la optimización.

Los niveles máximos de temperatura y tiempo de extracción (60 °C durante 30 minutos) se seleccionaron para evitar que la incubación de las muestras afectase al proceso de oxidación lipídica. Asimismo, 30 minutos de extracción permitieron la automatización del método debido a que se pudo llevar a cabo la separación cromatográfica de una muestra y la extracción mediante HS-SPME de la siguiente de manera simultánea. La Tabla 1.7 muestra el plan de experimentación.

Bloque	Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (min.)	Cantidad de muestra (g)	Agitación
1	1	60	10	1	Sí
	2	60	30	6	No
	3	40	30	6	Sí
	4	40	10	1	No
	5	50	20	3	Sí
	6	50	20	3	No
2	7	60	10	6	No
	8	50	20	3	No
	9	50	20	3	Sí
	10	40	30	1	No
	11	60	30	1	Sí
	12	40	10	6	Sí
3	13	50	20	3	Sí
	14	50	20	3	No
	15	40	10	6	No
	16	40	30	1	Sí
	17	60	10	6	Sí
	18	60	30	1	No
4	19	60	10	1	No
	20	40	10	1	Sí
	21	40	30	6	No
	22	50	20	3	Sí
	23	50	20	3	No
	24	60	30	6	Sí

Tabla 1.7: Matriz de experiencias generada para la optimización de los diferentes factores.

6. Extracción de lípidos totales.

Se homogeneizaron 250 mg de muestra con 2,5 mL de acetato de etilo durante 1 minuto. A continuación se añadieron 2,5 mL de etanol y se homogeneizó durante otro minuto. Se llevó a cabo el mismo procedimiento tras la adición sucesiva de 2,5 mL de hexano y 2,5 mL agua Milli-Q. Se separó la fase orgánica mediante centrifugación (3500 r.p.m. durante 10 minutos) y se eliminó el agua presente con una punta de espátula de sulfato sódico anhidro.

7. *Contenido total de grasa*

El contenido total de grasa se obtuvo mediante la determinación gravimétrica del residuo seco del extracto lipídico tal como describen Herben y Allen (2003). Brevemente, se pesaron cápsulas de aluminio libres de humedad. Posteriormente las cápsulas se colocaron en una placa calefactora y en cada cápsula se depositaron 200 μ L del extracto lipídico. Tras la evaporación del disolvente orgánico, se dejó enfriar la cápsula con los lípidos en un desecador y se determinaron éstos por diferencia de pesada. El contenido lipídico se expresó como gramos de grasa por cada 100 g de emulsión.

8. *Análisis de los ácidos grasos*

Los ácidos grasos se determinaron mediante derivatización a sus correspondientes ésteres metílicos de acuerdo con el método propuesto por Lepage & Roy (1986). Un volumen del extracto lipídico, correspondiente a 200 μ g de lípidos, se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso y se añadieron 0,4 mL de tolueno, 0,1 mL de patrón interno (ácido graso 19:0, no presente en organismos marinos, de concentración 0,1 mg/mL) y 2,0 mL de ácido sulfúrico al 1 % en MeOH. Las muestras se mezclaron mediante agitación intensa con vortex durante 30 s., y se incubaron a 50 °C durante unas 12 horas. Tras el enfriamiento, se añadieron 5 mL de una disolución acuosa de NaCl al 5 %, y se mezclaron por agitación intensa durante 30 s. Las fases de tolueno y MeOH/agua fueron separadas mediante centrifugación a 3500 r. p. m. durante 10 minutos y 1 μ L de la fase de tolueno fue inyectada en el GC-FID. Las condiciones de análisis son resumidas en la Tabla 1.8.

Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con una mezcla comercial de ésteres metílicos de 37 ácidos grasos (FAME, Mix). Los ácidos grasos ausentes en el patrón, e identificados en productos derivados de la pesca, se confirmaron mediante GC-MS, previa derivatización a los derivados 4,4-dimetiloxazonílicos (Garrido & Medina, 2002). La determinación cuantitativa se realizó a partir de los factores de respuesta obtenidos para los ésteres metílicos del patrón comercial.

<i>PerkinElmer Clarus 500</i>	
Inyector	PTV (inyector de vaporización de temperatura programada)
Temperatura	275°C
Presión (constante)	10 p.s.i.
Relación de split	1:10
Columna	SP-2330
Fase	Poli-(80 % biscianopropil/20 % cianopropilfenil siloxano)
Dimensiones	30 m x 0,25 mm x 0,20 µm
Gas portador	Nitrógeno
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	35°C (0 min)
Rampa	1°C/min (hasta 205°C)
Tª FID	260 °C
Detector	FID
Presión Hidrógeno	80 KPa
Presión de Aire	150 KPa

Tabla 1.8: Condiciones cromatográficas para la determinación de ácidos grasos.

9. Análisis sensorial

Las muestras enriquecidas se extrajeron de la estufa donde se encontraban almacenadas y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos antes de proceder al análisis. Éste fue realizado por un panel experto formado por cuatro personas entrenadas en la descripción de rancidez y se llevó a cabo inmediatamente después de la apertura de los matraces Erlenmeyer donde estaban contenidas las muestras. Los panelistas se concentraron en la detección de la rancidez utilizando una escala del 1 al 9, correspondiendo el 1 a la no percepción de la rancidez y el 9 a la detección alta de los olores correspondientes a la misma (Let, Jacobsen, Frankel & Meyer, 2003).

10. Determinación de los hidroperóxidos con dienos y trienos conjugados

Una alícuota del extracto lipídico, dependiendo de la cantidad de hidroperóxidos contenidos en la muestra, fue evaporada a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Los lípidos fueron redisolultos en 200 µL de hexano y 5 mL de etanol y a continuación se midió la absorbancia de las disoluciones a $\lambda=234$ nm para los dienos conjugados y a $\lambda=268$ nm para los

trienos conjugados. El contenido de hidroperóxidos con dobles y triples enlaces conjugados se expresó en milimoles de hidroperóxido/Kg de aceite empleándose la siguiente ecuación derivada de la ley de Beer (AOCS, 1989):

$$\text{mmol hidroperóxido/Kg de aceite} = [(A \times V)/(\epsilon \times b \times V' \times d)] \times$$

Donde A representa el valor de absorbancia, V el volumen final en mL, ϵ el coeficiente de absorptividad molar de los hidroperóxidos conjugados (considerándose el valor correspondiente al ácido linoleico: 29000 mL mmol⁻¹ cm⁻¹ (Chan, 1987), b el recorrido óptico de la cubeta (en este caso 1 cm), V' los mL de muestra empleados y d la densidad de la emulsión, expresada en g/mL (0,987 g/mL).

1.2.2.3. Análisis estadístico

Todos los experimentos y análisis fueron realizados al menos por duplicado. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1981) y las medias fueron comparadas por el método de la diferencia de los mínimos cuadrados. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows, versión 5.1, con la significancia declarada a $p < 0,05$.

1.2.3. Resultados y discusión

1.2.3.1. Optimización del método

1. Pruebas preliminares

Debido a la alta volatilidad de los analitos, todos los experimentos se realizaron utilizando la técnica SPME en modo espacio de cabeza (HS-SPME). Los primeros experimentos se llevaron a cabo con objeto de detectar y separar cromatográficamente los volátiles generados en la emulsión de aceite en agua tras su oxidación. Para ello se hizo una primera extracción de 1 g de muestra con la fibra CAR-PDMS incubándola durante 15 minutos a 60°C. En estas condiciones fueron separados hasta 106 compuestos de los cuales 80 fueron identificados mediante comparación de los espectros de masas con los de las librerías Mainlib, Wiley 6 y Replib o por comparación con los tiempos de retención de compuestos puros (Tabla 1.9). 16 de esos compuestos fueron seleccionados para la optimización del método (Tabla 1.10) ya que han sido relacionados, en la literatura, con la oxidación lipídica en aceite de pescado, emulsiones de aceite de pescado y músculo de pescado (Jacobsen, Timm & Meyer, 2001, Kulås, Olsen & Ackman, 2002, Medina, Satué-Gracia & Frankel, 1999, Olafsdottir, Jónsdóttir, Lauzon, Luten & Kristbergsson, 2005). La Fig. 1.10. muestra el cromatograma obtenido.

Compuesto	Identificación
Alcoholes	
Etanol	MS, STD
1-Propanol	MS
2-Metil-1-propanol	MS
1-Penten-3-ol	MS, STD
1-Pentanol	MS
2-Penten-1-ol	MS
2-Hepten-1-ol	MS
3-Pentanol	MS
3-Hexen-1-ol	MS
1-Hexanol	MS
4-Heptanol	MS
1-Octen-3-ol	MS, STD
1-Octanol	MS
2-Octen-1-ol	MS
2-Nonen-1-ol	MS
Fenol	MS
Ar-Etenil-bencenometanol	MS
6,11-Hexadecadien-1-ol	MS
2-Hexil-1-decanol	MS
Etillinalol	MS
Aldehídos	
Acetaldehído	MS, STD
Propanal	MS, STD
2-Metilpropanal	MS
Butanal	MS, STD
Pentanal	MS, STD
E-2-pentenal	MS, STD
Hexanal	MS, STD
E-2-hexenal	MS, STD
Heptanal	MS, STD
Z-4-heptenal	MS, STD
E-2-heptenal	MS, STD
Benzaldehído	MS, STD
Aminas	
Trimetilamina	MS
Compuestos aromáticos	
Tolueno	MS, STD
Etilbenzeno	MS
Xileno (3 isómeros)	MS
Estireno	MS
Propilbenceno	MS
C-3-Benceno (2 isómeros)	MS

Compuesto	Identificación
Ésteres	
Acetato de etilo	MS, STD
Furanos	
2-Metilfurano	MS
2-Etilfurano	MS, STD
2-Pentilfurano	MS, STD
Hidrocarburos	
Pentano	MS, STD
3-Metil-1-butano	MS
2-Pentano	MS
2-Metil-1,3-Pentadieno	MS
1,4-Pentadieno	MS
Hexano	MS, STD
Octano	MS
1-Octadecano	MS
Pentadecano	MS
Eicosano	MS
5-Eicoseno	MS
5-Nonadeceno	MS
Nonadecano	MS
5-Nonadeceno	MS
Octadecano	MS
Cetonas	
Acetona	MS, STD
2,3-Butanodiona	MS
2-Pentanona	MS
1-Penten-3-ona	MS, STD
3-Pentanona	MS
2,3-Pentanodiona	MS, STD
3-Hidroxi-2-butanona	MS
3,3-Dimetil-2-butanona	MS
2-Hidroxi-3-pentanona	MS
6-Metil-2-heptanona	MS
2,3-Octanodiona	MS
6-Octen-2-ona	MS
2-Nonanona	MS
Acetofenona	MS
3,5-Octadien-2-ona	MS
4-Metil-ciclohexanona	MS
Miscelánea	
Diclorometano	MS, STD
Cloroformo	MS, STD
Disulfuro de carbono	MS

Tabla 1.9: Compuestos identificados en la emulsión oxidada de aceite de pescado en agua. La identificación se llevó a cabo por comparación con compuestos de referencia en base a los espectros de masas extraídos de librerías (MS) y a los tiempos de retención de espectros obtenidos tras la inyección de patrones puros (STD).

	<i>Nombre</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
1	Acetaldehído	1,65
2	Pentano	1,76
3	Propanal	2,45
4	Butanal	4,46
5	2-Etilfurano	5,59
6	1-Penten-3-ona	7,96
7	Pentanal	8,22
8	1-Penten-3-ol	8,59
9	Octano	9,18
10	E-2-pentenal	12,31
11	Hexanal	13,15
12	E-2-hexenal	16,96
13	Heptanal	17,64
14	2-Pentilfurano	18,85
15	E-2-heptenal	19,38
16	(E,E)-2,4-heptadienal	20,94
Patrón interno (IS)	3-Metil-3-buten-1-ol	11,46

Tabla 1.10: Compuestos seleccionados para la optimización del método de determinación de volátiles.

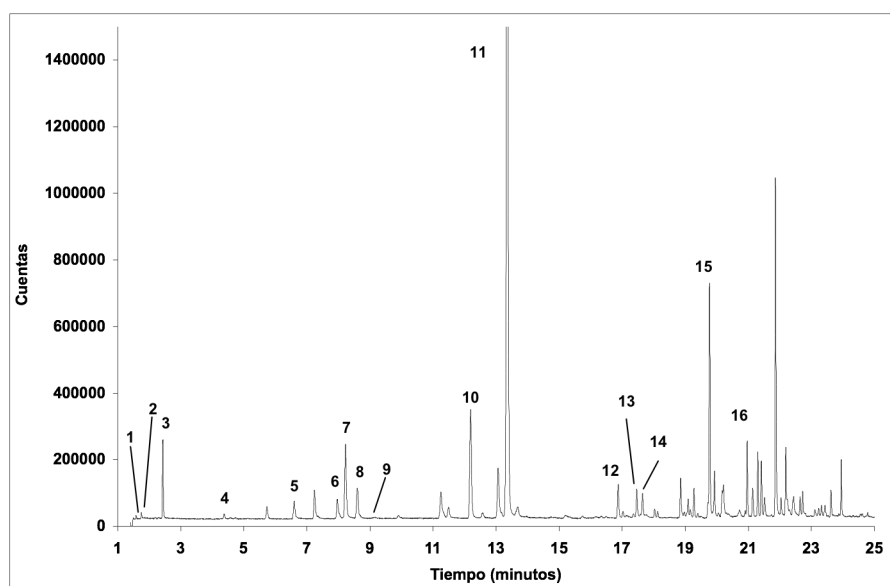


Figura 1.10: Cromatograma obtenido a partir de la extracción de los volátiles presentes en el espacio de cabeza de una emulsión oxidada de aceite en agua. Los números corresponden a los compuestos seleccionados para la optimización del método mostrados en la Tabla 1.10.

2. Tipo de fibra

Se testaron 3 recubrimientos de fibra para la extracción de los analitos: CAR-PDMS, PDMS-DVB Y CW-DVB. Las extracciones fueron llevadas a cabo por triplicado, con alícuotas de 1 g de la misma emulsión, incubando las muestras durante 15 minutos a 60 °C. Las temperaturas de desorción en el inyector fueron 300, 250 y 220 °C respectivamente para cada fibra, en base a las recomendaciones del proveedor sobre las temperaturas máximas de trabajo de los distintos recubrimientos. La Fig. 1.11 muestra los cromatogramas obtenidos tras la extracción de una emulsión oxidada de aceite de pescado en agua mientras que la Fig 1.12 muestra las áreas normalizadas obtenidas con cada fibra para los 16 analitos seleccionados. La fibra CAR-PDMS mostró los mejores resultados en cuanto a sensibilidad con un rendimiento muy superior a las demás. Esta fibra porosa está indicada para la extracción de compuestos con un bajo peso molecular (Stashenko & Martínez, 2007) como los seleccionados para la optimización de este método.

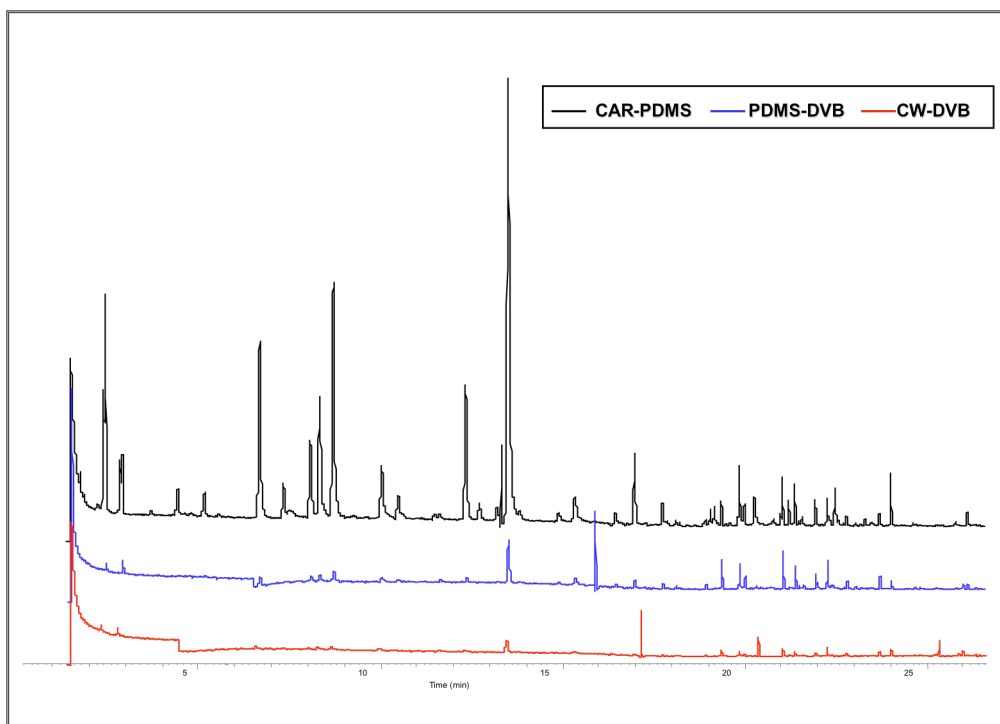


Figura 1.11: Cromatogramas obtenidos tras la extracción de los volátiles de una emulsión oxidada de aceite en agua con diferentes fibras de SPME.

Además de una mayor sensibilidad, el recubrimiento de CAR-PDMS consiguió la extracción de una mayor cantidad de volátiles tal y como muestran los cromatogramas (Fig. 1.11). En cuanto a la repetibilidad de las diferentes fibras, CAR-PDMS mostró unos coeficientes de variación de entre 5,0 % y 14,0 % dependiendo del analito, PDMS-DVB entre el 7,2 % y el 17,3 % y CW-DVB entre el 5,0 % y el 22,4 %. Por lo tanto, el recubrimiento poroso de CAR-PDMS fue seleccionado para llevar a cabo los experimentos posteriores.

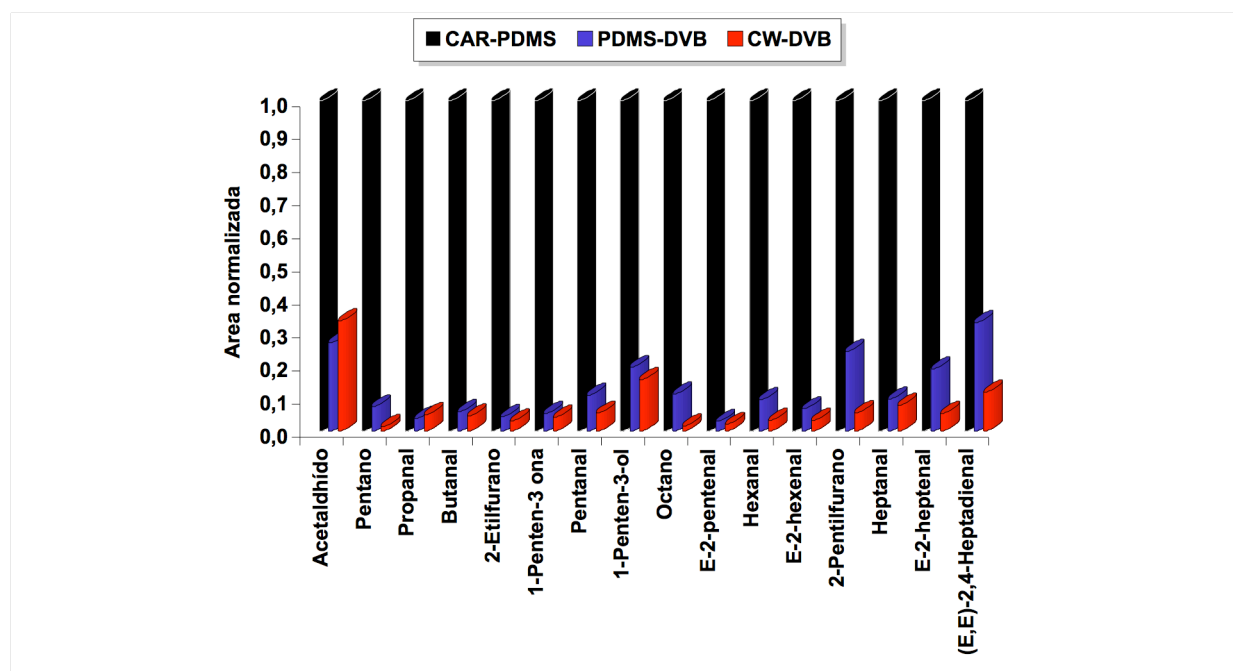


Figura 1.12: Áreas normalizadas obtenidas tras la extracción de los volátiles seleccionados mediante HS-SPME con diferentes fibras.

En cuanto al tiempo de desorción, se efectuó una primera extracción con el recubrimiento de CAR-PDMS, desorbiendo los analitos durante 2 minutos y, a continuación, se realizó una segunda inyección para evaluar el efecto memoria de la fibra. No se observó ningún compuesto en este segundo cromatograma por lo que 2 minutos se consideraron suficientes para la completa desorción de los volátiles. Se estableció un tiempo de desorción de 10 minutos con objeto de conseguir una limpieza completa de la fibra de posibles restos no detectados en el cromatograma, ya que ese incremento de tiempo no afectó a la resolución de los picos.

3. Optimización conjunta de cantidad de muestra, temperatura y tiempo de extracción y agitación. Diseño experimental.

La Fig. 1.13 muestra las gráficas Pareto obtenidas para varios de los analitos, tras la realización de los experimentos contenidos en el diseño experimental. Estos resultados fueron representativos de los obtenidos para los restantes analitos. El factor temperatura de incubación fue significativo para 11 de los 16 analitos estudiados: acetaldehído, Z-4-heptenal, E,E-2,4-heptadienal, heptanal, hexanal, E-2-hexenal, pentanal, E-2-pentenal, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona y 2-pentilfurano. En todos los casos, mostró un efecto positivo lo que significa que las mejores extracciones se obtuvieron incubando las muestras a 60°C. Un resultado similar fue obtenido para el factor tiempo de incubación. Éste resultó estadísticamente significativo para heptanal, hexanal, E-2-hexenal, pentanal, E-2-pentenal y 1-penten-3-ona, mostrando un efecto positivo en todos los casos, es decir, se obtuvo una mayor respuesta al aumentar el tiempo de incubación. El factor masa de muestra se mostró significativo para heptanal, hexanal, E-2-hexenal, octano, pentanal, 1-penten-3-ona y propanal. En todos estos casos, dicho factor presentó un efecto negativo, consiguiéndose las mayores respuestas extrayendo los volátiles con 1 g de emulsión. Este resultado contradice los estudios realizados por Górecki & Pawliszyn (1997) que afirman que para mejorar la eficacia de la extracción mediante HS-SPME es conveniente utilizar la mayor cantidad posible de muestra, reduciendo el volumen de espacio de cabeza sobre la misma. Una explicación a este resultado ha sido expuesto por Kanavouras, Kiritsakis & Hernández (2005). Estos autores atribuyen este fenómeno a las posibles interacciones competitivas entre los analitos por los lugares activos de la fibra al existir una excesiva concentración en el espacio de cabeza, provocando una reducción de la difusión al recubrimiento poroso. El factor agitación no fue significativo para ninguno de los volátiles analizados. Aún así, la interacción de este factor con la temperatura de extracción sí fue significativa para varios de los analitos, obteniéndose las mayores respuestas incubando las muestras a 60 °C con agitación (niveles altos de ambos factores) (Fig. 1.14). Por lo tanto, se decidió realizar los siguientes experimentos con agitación, favoreciendo la difusión de los analitos al espacio de cabeza y disminuyendo el tiempo necesario para conseguir la máxima extracción (Pawliszyn, 1997).

La Fig. 1.14 muestra los gráficos de interacciones obtenidos en este análisis. En ellos se observa como, en los casos en que éstas son significativas, las mejores respuestas son coincidentes con los valores anteriormente descritos.

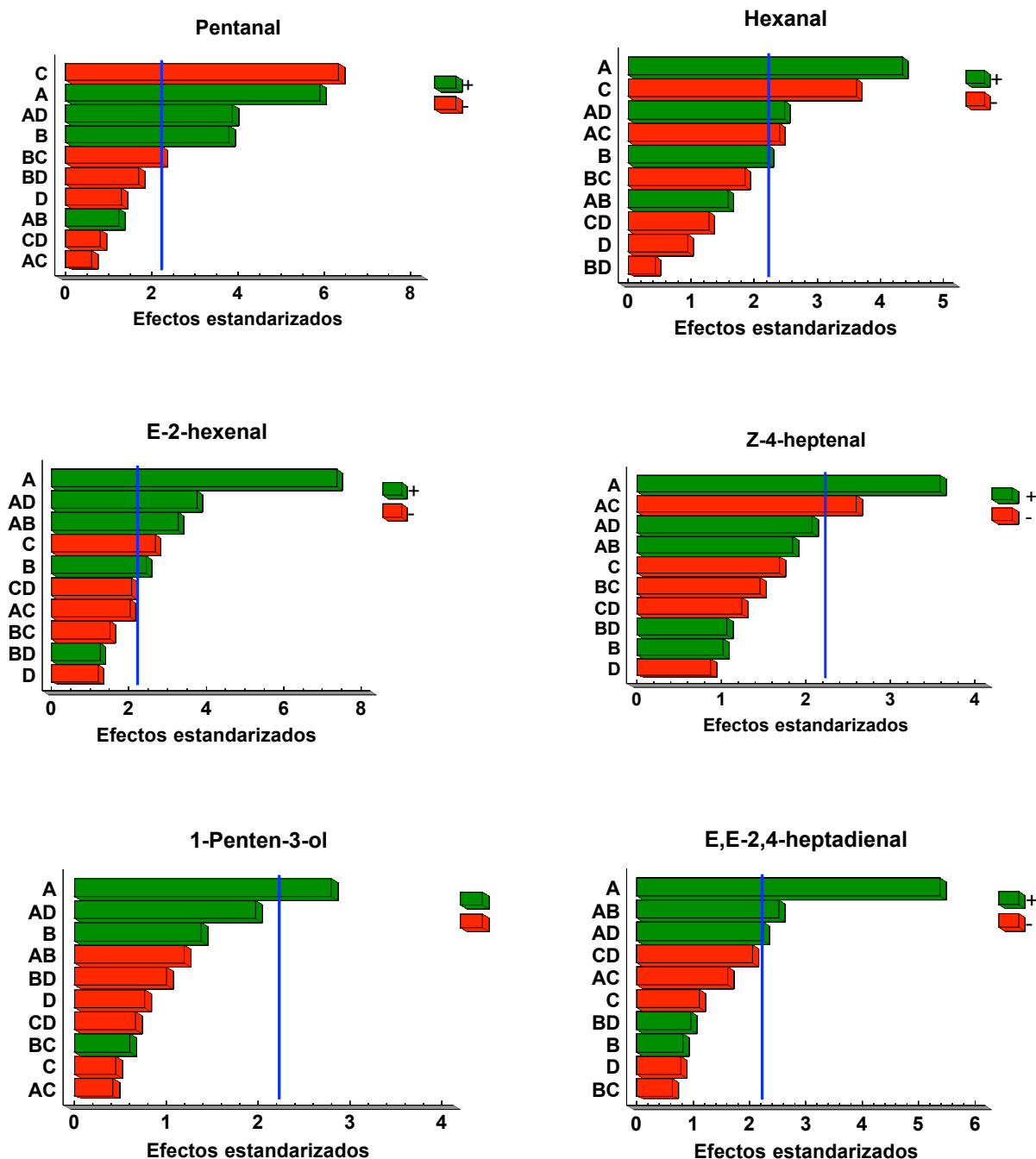


Figura 1.13: Gráficos Pareto para varios de los analitos estudiados. Los factores estudiados fueron temperatura de extracción (A), tiempo de extracción (B), masa de muestra (C) y agitación (D).

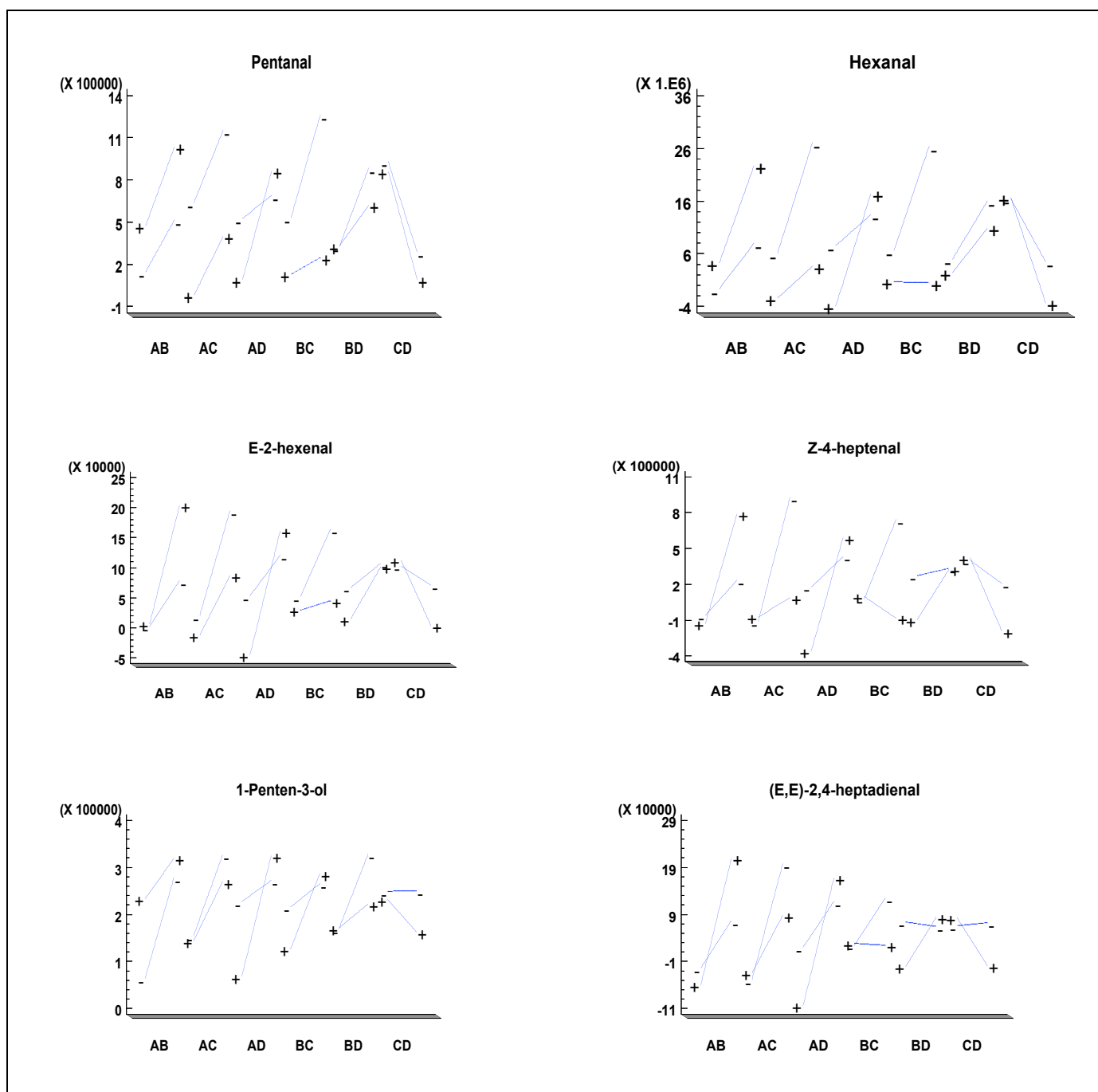


Figura 1.14: Interacciones de primer orden de los distintos factores. Los factores estudiados fueron temperatura de extracción (A), tiempo de extracción (B), masa de muestra (C) y agitación (D).

Los resultados que arrojó el diseño experimental indicaron que todos los factores, excepto la agitación, resultaron significativos para alguno de los analitos. Tiempo y temperatura de extracción mostraron un efecto positivo obteniéndose las mayores respuestas incubando las muestras durante 30 minutos a 60°C. Aunque el tipo de diseño elegido no optimiza respuestas, si no que tan solo da información acerca de los factores que resultan significativos, los valores indicados fueron seleccionados como los óptimos en este método ya que habitualmente se correlacionan positivamente con la eficacia de la extracción mediante HS-SPME. En cuanto al factor cantidad de muestra, se realizó un estudio más exhaustivo a valores más bajos de los utilizados en el diseño. Se llevaron a cabo los análisis de muestras de emulsión oxidada, en las condiciones fijadas anteriormente y variando tan sólo las cantidades de muestra entre 0,1 y 1 g (Fig. 1.15).

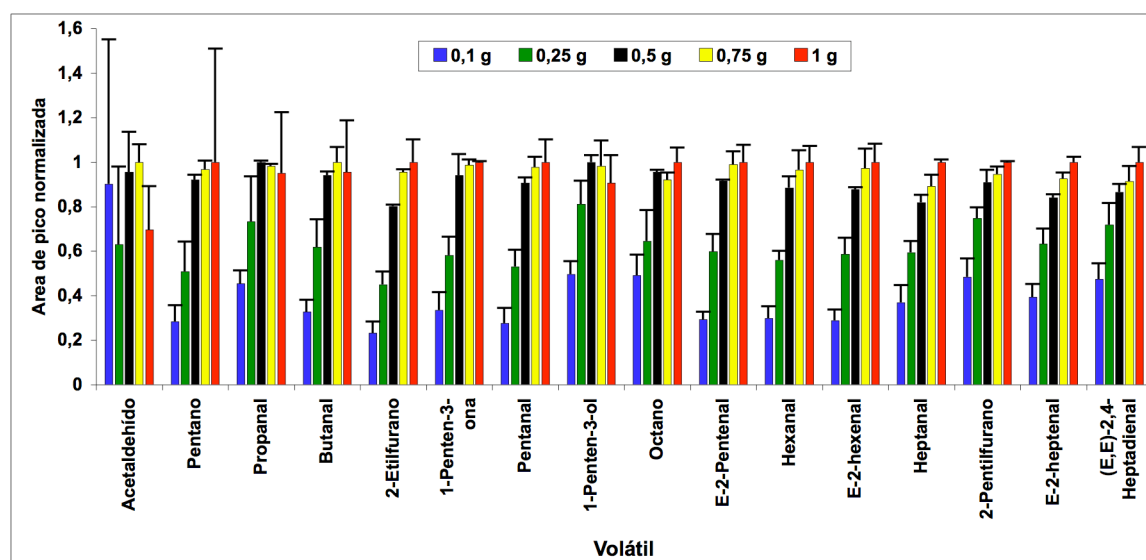


Figura 1.15: Influencia de la cantidad de muestra en el proceso de HS-SPME de una emulsión oxidada.

Para la mayoría de los analitos se observó un incremento en la respuesta obtenida entre 0,1 y 0,5 g, pero no hubo diferencias significativas entre las respuestas obtenidas para 0,5, 0,75 y 1 g. Únicamente cinco analitos mostraron un incremento poco significativo. Por lo tanto, se fijaron 0,5 g como solución de compromiso para minimizar la cantidad de muestra utilizada para llevar a cabo los análisis. Debido a la distinta naturaleza de los alimentos emulsionados enriquecidos, se realizó un estudio similar relacionando la eficacia de extracción y la cantidad de muestra en leche

y mayonesa enriquecidas en aceite de pescado y posteriormente oxidadas, en un rango comprendido entre 0,5 y 6 g (Fig. 1.16). Para la mayoría de los volátiles, la respuesta fue mayor cuanto menor fue la cantidad de emulsión utilizada para la extracción, al igual que lo observado en emulsiones de aceite de pescado en agua. En vista de estos resultados, se optó por la utilización de 0,5 g de muestra en el análisis de volátiles contenidos ambas matrices. Las Fig. 1.17 y 1.18 muestran los cromatogramas obtenidos tras la extracción y determinación de los volátiles contenidos en muestras de leche y mayonesa enriquecidas en aceite de pescado en las condiciones optimizadas.

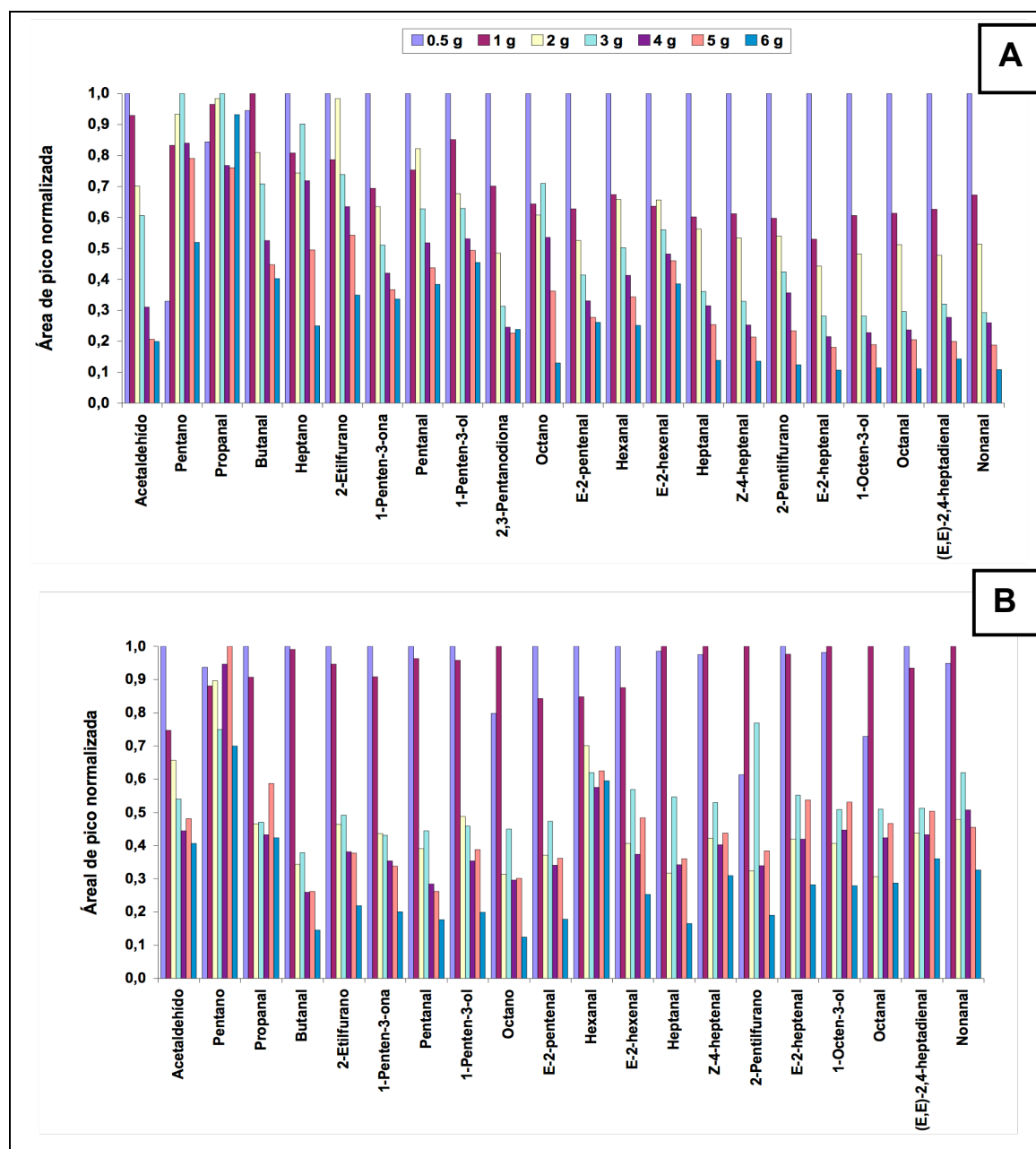


Figura 1.16: Efecto de la cantidad de muestra en alimentos enriquecidos en aceite de pescado: A) Leche y B) Mayonesa.

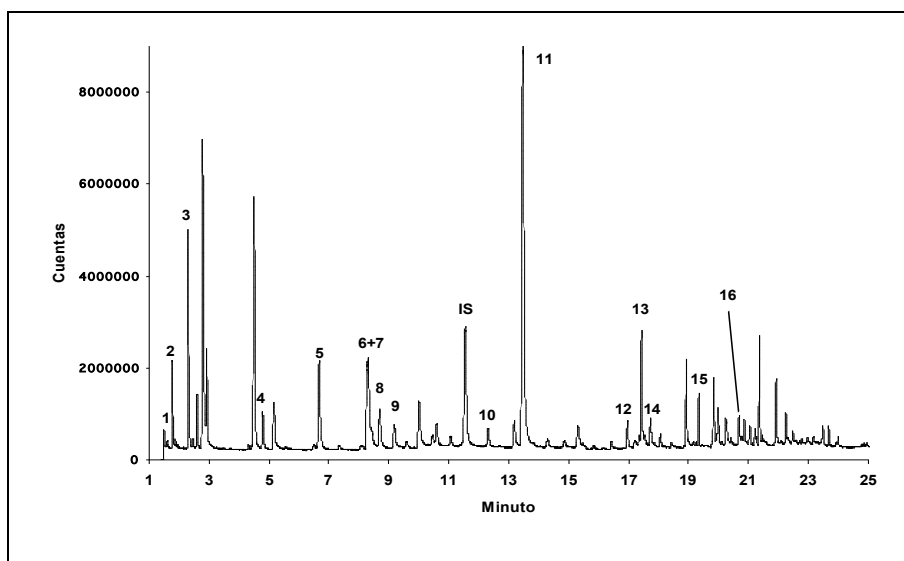


Figura 1.17: Cromatograma obtenido tras la extracción y análisis de una muestra oxidada de leche enriquecida en aceite de pescado en las condiciones optimizadas.

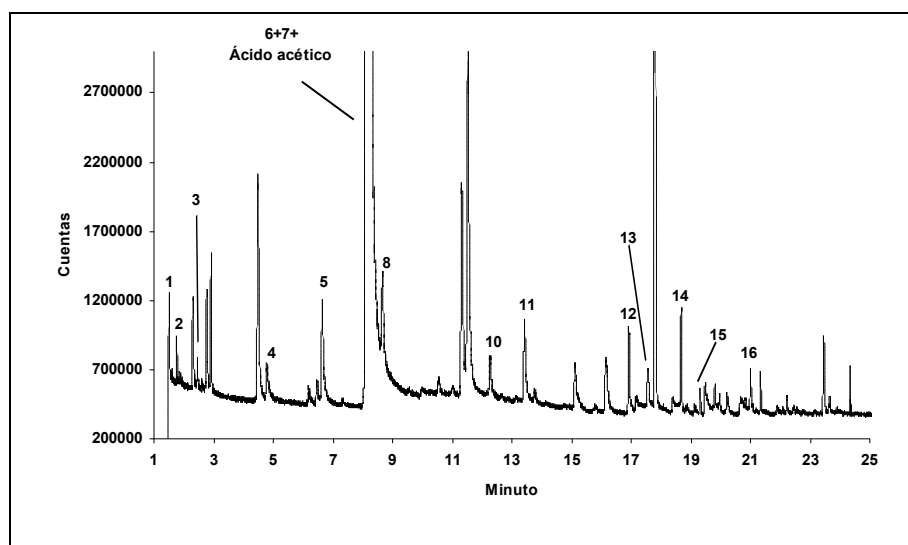


Figura 1.18: Cromatograma obtenido tras la extracción y análisis de una muestra oxidada de mayonesa enriquecida en aceite de pescado en las condiciones optimizadas.

1.2.3.2. Validación

1. Linealidad

La linealidad de respuesta fue investigada mediante la utilización de muestras de leche y mayonesa, enriquecidas en aceite de pescado no oxidado, a las que se le adicionaron mezclas de patrones de los compuestos utilizados para la optimización del método. El rango de concentraciones estudiado fue de 0 a 1 µg/g (6 niveles) y se utilizó el 3-Metil-3-buten-1-ol como patrón interno. Los resultados fueron satisfactorios en ambas matrices obteniéndose en todos los casos coeficientes de correlación mayores de 0,99 (Tablas 1.11 y 1.12).

<i>Leche</i>			
Compuesto	Pendiente ± SD	Ordenada ± SD	Coeficiente
Acetaldehído	$6,213 \times 10^{-06} \pm 4,815 \times 10^{-08}$	$0,001 \pm 0,000$	0,9948
Pentano	$4,560 \times 10^{-04} \pm 1,352 \times 10^{-05}$	$0,004 \pm 0,007$	0,9964
Propanal	$2,865 \times 10^{-05} \pm 1,190 \times 10^{-06}$	$0,010 \pm 0,001$	0,9949
Butanal	$1,413 \times 10^{-04} \pm 3,078 \times 10^{-06}$	$-0,001 \pm 0,002$	0,9954
2-Etilfurano	$7,935 \times 10^{-04} \pm 3,270 \times 10^{-05}$	$-0,027 \pm 0,014$	0,9944
1-Penten-3-ona	$3,995 \times 10^{-04} \pm 1,311 \times 10^{-05}$	$-0,007 \pm 0,008$	0,9930
Pentanal	$5,327 \times 10^{-04} \pm 1,460 \times 10^{-05}$	$-0,014 \pm 0,008$	0,9936
1-Penten-3-ol	$1,765 \times 10^{-04} \pm 4,737 \times 10^{-06}$	$0,004 \pm 0,003$	0,9929
Octano	$1,870 \times 10^{-04} \pm 9,194 \times 10^{-06}$	$0,000 \pm 0,005$	0,9938
E-2-pentenal	$2,392 \times 10^{-04} \pm 6,492 \times 10^{-06}$	$-0,001 \pm 0,004$	0,9911
Hexanal	$8,304 \times 10^{-04} \pm 3,770 \times 10^{-05}$	$-0,024 \pm 0,018$	0,9953
E-2-hexenal	$1,250 \times 10^{-04} \pm 4,203 \times 10^{-06}$	$-0,001 \pm 0,002$	0,9902
Heptanal	$3,828 \times 10^{-04} \pm 1,263 \times 10^{-05}$	$-0,013 \pm 0,007$	0,9853
2-Pentilfurano	$3,509 \times 10^{-04} \pm 1,263 \times 10^{-05}$	$-0,017 \pm 0,008$	0,9927
E-2-heptenal	$2,002 \times 10^{-04} \pm 8,749 \times 10^{-06}$	$-0,006 \pm 0,005$	0,9904
(E,E)-2,4-heptadienal	$2,054 \times 10^{-04} \pm 2,038 \times 10^{-05}$	$-0,014 \pm 0,011$	0,9941

Tabla 1.11: Evaluación de la linealidad en leche enriquecida en aceite de pescado.

Mayonesa			
Compuesto	Pendiente ± SD	Ordenada ± SD	Coefficiente
Acetaldehído	$2,483 \times 10^{-05} \pm 9,051 \times 10^{-08}$	$0,003 \pm 0,000$	0,9945
Pentano	$1,416 \times 10^{-04} \pm 2,448 \times 10^{-05}$	$0,028 \pm 0,012$	0,9959
Propanal	$4,478 \times 10^{-04} \pm 7,453 \times 10^{-08}$	$0,002 \pm 0,000$	0,9977
Butanal	$4,809 \times 10^{-05} \pm 5,592 \times 10^{-06}$	$0,014 \pm 0,003$	0,9964
2-Etilfurano	$4,215 \times 10^{-04} \pm 1,765 \times 10^{-05}$	$0,021 \pm 0,010$	0,9991
1-Penten-3-ona	$1,037 \times 10^{-04} \pm 3,926 \times 10^{-05}$	$0,023 \pm 0,000$	0,9977
Pentanal	$8,462 \times 10^{-05} \pm 2,532 \times 10^{-06}$	$0,007 \pm 0,001$	0,9970
1-Penten-3-ol	$2,704 \times 10^{-04} \pm 2,266 \times 10^{-05}$	$0,016 \pm 0,014$	0,9997
Octano	$5,040 \times 10^{-04} \pm 1,397 \times 10^{-04}$	$0,039 \pm 0,042$	0,9988
<i>E</i> -2-pentenal	$1,733 \times 10^{-04} \pm 1,185 \times 10^{-05}$	$0,008 \pm 0,009$	0,9985
Hexanal	$3,495 \times 10^{-04} \pm 2,382 \times 10^{-05}$	$0,084 \pm 0,013$	0,9965
<i>E</i> -2-hexenal	$8,060 \times 10^{-05} \pm 1,165 \times 10^{-06}$	$0,001 \pm 0,001$	0,9948
Heptanal	$1,737 \times 10^{-04} \pm 7,895 \times 10^{-06}$	$-0,006 \pm 0,005$	0,9997
2-Pentilfurano	$2,483 \times 10^{-05} \pm 9,051 \times 10^{-08}$	$0,003 \pm 0,000$	0,9945
<i>E</i> -2-heptenal	$1,416 \times 10^{-04} \pm 2,448 \times 10^{-05}$	$0,028 \pm 0,012$	0,9959
(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	$4,478 \times 10^{-04} \pm 7,453 \times 10^{-08}$	$0,002 \pm 0,000$	0,9977

Tabla 1.12: Evaluación de la linealidad en mayonesa enriquecida en aceite de pescado.

2. Límites de detección

Los límites de detección se evaluaron como la concentración de analito correspondiente a una señal analítica 3 veces superior a la desviación estándar del blanco para cada uno de los volátiles tanto en leche como en mayonesa. Los valores calculados para cada tipo de muestra fueron lo suficiente bajos para la detección de la oxidación lipídica en los primeros estadios del proceso (Tabla 1.13).

<i>Compuesto</i>	<i>LOD (S/N = 3) (ng/g)</i>	
	<i>Leche</i>	<i>Mayonesa</i>
Acetaldehído	3,62 ± 0,00	6,58 ± 0,53
Pentano	1,69 ± 0,01	0,34 ± 0,01
Propanal	0,18 ± 0,02	0,64 ± 0,07
Butanal	0,16 ± 0,04	3,71 ± 0,43
2-Etilfurano	0,21 ± 0,03	0,44 ± 0,00
1-Penten-3-ona	0,22 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Pentanal	0,38 ± 0,09	0,58 ± 0,06
1-Penten-3-ol	0,12 ± 0,00	0,24 ± 0,01
Octano	0,72 ± 0,17	1,10 ± 0,14
<i>E</i> -2-pentenal	0,25 ± 0,02	0,93 ± 0,07
Hexanal	0,52 ± 0,02	0,72 ± 0,08
<i>E</i> -2-hexenal	0,29 ± 0,02	1,13 ± 0,04
Heptanal	0,66 ± 0,03	2,91 ± 0,14
2-Pentilfurano	0,17 ± 0,04	0,30 ± 0,00
<i>E</i> -2-heptenal	1,20 ± 0,32	3,24 ± 0,20
(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	0,27 ± 0,04	1,84 ± 0,11

Tabla 1.13: Límites de detección obtenidos en cada una de las matrices estudiadas.

3. *Precisión y exactitud*

La repetibilidad de los análisis fue evaluada analizando 8 réplicas de la emulsión oxidada de aceite de pescado en agua mostrando unos valores de RSD de entre 3 % y 13 % dependiendo del analito. La reproducibilidad fue estudiada en muestras de emulsiones de aceite de pescado en agua, tanto frescas como oxidadas que fueron almacenadas a -80°C durante 5 días. Los resultados mostraron una variabilidad de entre el 6,7 % y 18,1 % para emulsiones no oxidadas y entre el 6,3 % and 18,5 % en las emulsiones oxidadas. Sólo el propanal mostró valores mayores en las muestras oxidadas llegando a un RSD del 28,7 %. Estos valores de reproducibilidad son importantes en cuanto a que el método ofrece la posibilidad de efectuar cinéticas de oxidación de varios días sin la necesidad de realizar los análisis en el momento del muestreo.

Para evaluar la repetibilidad en alimentos enriquecidos, 6 réplicas de leche y 6 de mayonesa enriquecidas y oxidadas, fueron analizadas el mismo día. Las precisiones estimadas, corregidas con el patrón interno se recogen en la Tabla 1.14. En todos los casos las RSD fueron menores del 10 %.

Las recuperaciones fueron evaluadas en muestras enriquecidas no oxidadas tras la adición de los volátiles a dos niveles: 500 y 1000 ng/g. La mayoría mostraron recuperaciones entre el 80 y el 120 % excepto en los casos de acetaldehído, pentano y propanal (Tabla 1.14).

Compuesto	Leche			Mayonesa		
	Recuperación 1000 ng/g (%)	Recuperación 500 ng/g (%)	RSD n=6 (%)	Recuperación 1000 ng/g (%)	Recuperación 500 ng/g (%)	RSD n=6 (%)
Acetaldehído	80,7	88,3	6,1	54,1	100,4	10,7
Pentano	95,1	76,1	15,7	99,8	102,1	8,8
Propanal	95,9	113,0	9,2	84,7	87,4	14,7
Butanal	103,5	98,9	7,9	97,1	100,5	5,9
2-Etilfurano	115,0	90,2	8,7	90,4	103,8	7,7
1-Penten-3-ona	109,4	95,3	7,7	86,8	93,6	8,5
Pentanal	105,4	88,9	7,8	86,2	82,6	7,8
1-Penten-3-ol	105,0	93,9	7,1	101,5	109,5	7,4
Octano	117,5	94,7	7,6	84,8	87,9	5,0
<i>E</i> -2-pentenal	106,8	89,5	7,8	109,4	105,1	6,3
Hexanal	104,1	84,0	7,5	96,2	91,0	7,2
<i>E</i> -2-hexenal	112,0	90,9	10,2	104,2	100,3	8,6
Heptanal	105,4	82,7	9,4	108,3	115,7	6,4
2-Pentilfurano	115,1	80,8	8,3	86,5	92,6	8,7
<i>E</i> -2-heptenal	119,6	84,5	9,5	99,2	106,5	6,4
(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	118,8	85,8	9,7	114,0	116,6	8,6

Tabla 1.14: Estudio de la precisión y exactitud en muestras reales enriquecidas.

1.2.3.3. Seguimiento de la oxidación lipídica en muestras enriquecidas en aceite de pescado mediante el análisis de volátiles.

El método desarrollado fue aplicado a la determinación de compuestos volátiles en leche y mayonesa enriquecidas en aceite de pescado. La composición lipídica de las muestras enriquecidas se muestra en la Tabla 1.15.

	<i>Leche (%)</i>	<i>Mayonesa (%)</i>
14:0	1,2	1,1
15:0	0,2	
16:0	10,9	8,2
16:1- ω 7	0,8	1,7
17:0		0,2
18:0	9,0	3,6
18:1- ω 9	64,6	24,2
18:1- ω 7		1,6
18:2- ω 6	8,4	49,4
18:3- ω 3	0,7	0,7
18:4- ω 3	0,4	0,5
20:4- ω 6	0,8	0,6
20:1- ω 9	0,5	2,3
20:5- ω 3	1,0	
22:1- ω 11		1,6
20:5- ω 3		1,8
22:5- ω 3	0,1	0,3
22:6- ω 3	1,4	2,5
Grasa total	7,2	93,4

Tabla 1.15: Composición lipídica de las muestras reales enriquecidas.

En primer lugar fueron identificados los volátiles que se formaron durante la oxidación de ambas matrices. En el caso de la leche, el hexanal fue el compuesto que se formó en mayor concentración mientras que en la mayonesa, a excepción del ácido acético añadido en su elaboración, los compuestos 1-penten-3-ol, hexanal, *E*-2-hexenal y 2-etilfurano fueron los que mostraron las mayores áreas de pico.

1. Oxidación de muestras de leche enriquecida en aceite de pescado

Los olores asociados con la oxidación lipídica se detectaron tras 2 días de almacenamiento tal y como muestran los resultados del análisis sensorial (Tabla 1.16).

	<i>Leche enriquecida</i>				
Día	0	1	2	3	4
Análisis sensorial	Sin olor	Sin olor	Incipiente	Rancio	Rancio

Tabla 1.16: Análisis sensorial de leche enriquecida durante su almacenamiento a 30 °C

La Fig. 1.19 muestra las cinéticas obtenidas en varios de los volátiles analizados. En casi todos los casos, se observó un aumento en la concentración entre los días 1 y 2 coincidiendo con la detección sensorial de la rancidez.

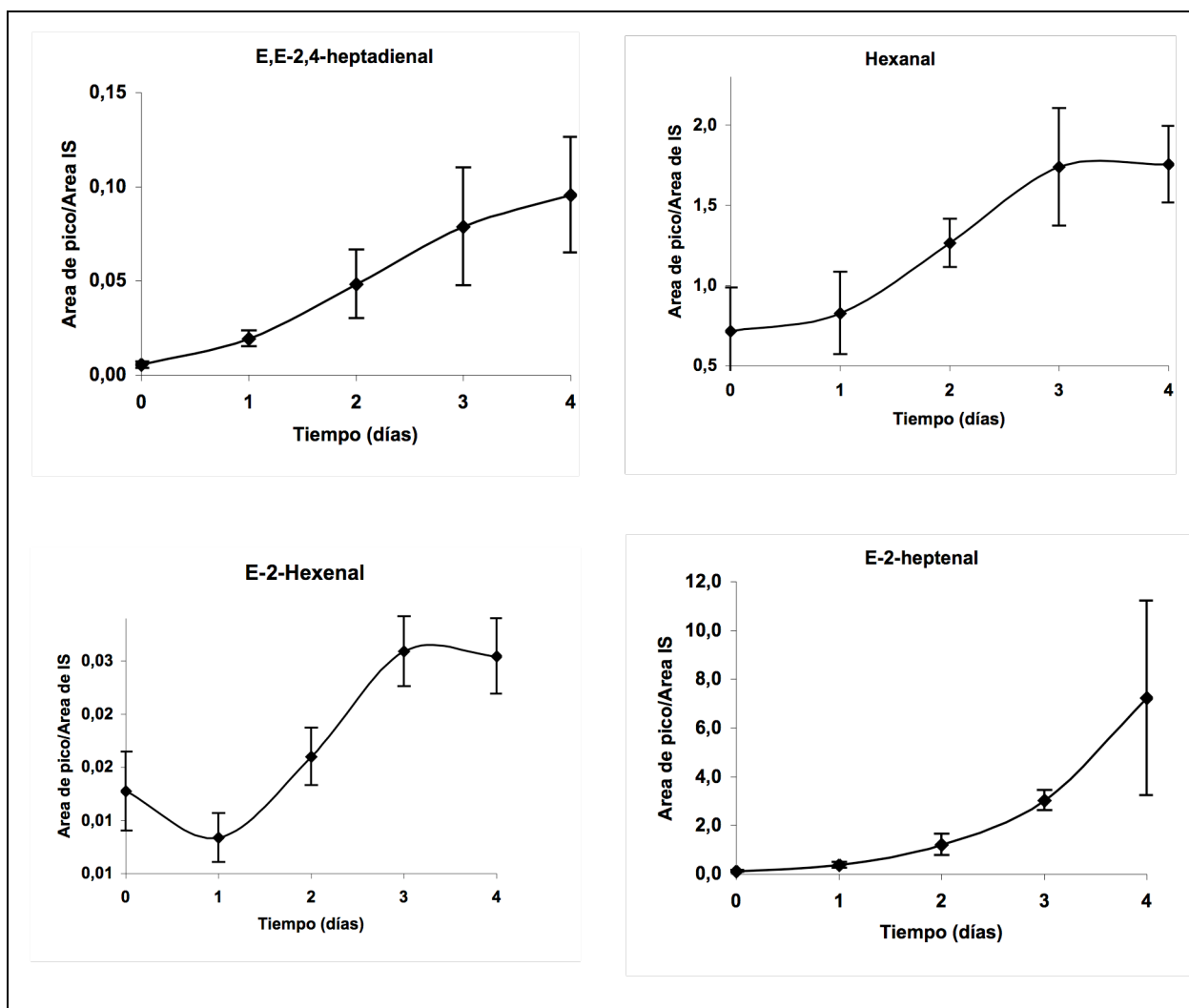


Figura 1.19: Evolución de cuatro de los volátiles analizados en leche enriquecida durante su almacenamiento a 30°C.

La Fig. 1.20 muestra las cinéticas de formación de los dienos y trienos conjugados en las que se observa una evolución muy similar a la de las cinéticas de formación de volátiles. Aunque la formación de dienos no mostró un periodo de inducción evidente, sí se observó un aumento en la concentración de trienos tras el primer día de experimento. El periodo de inducción fue de

1,1 días, valor muy similar a los obtenidos en la mayoría de los volátiles (Tabla 1.17). Los coeficientes de correlación de Pearson (Tabla 1.17) fueron calculados al enfrentar los valores de dienos y trienos conjugados con los de las áreas de los volátiles. Los análisis de (E,E)-2,4-heptadienal, hexanal, E-2-hexenal, E-2-heptenal y butanal, fueron los que mostraron la mayor correlación con los índices clásicos de monitorización de la oxidación durante el almacenamiento de la leche. Por lo tanto fueron elegidos como los mejores marcadores del deterioro oxidativo en este tipo de matrices.

Además de correlacionarse bien con la oxidación lipídica, el análisis de volátiles mediante esta metodología se mostró muy sensible para la detección del deterioro lipídico. Como un ejemplo, destacan los valores de área de pico/área de IS en hexanal y E-2-hexenal que mostraron un aumento del 50 % y del 81 % entre los días 1 y 2, coincidentes con el período de inducción mientras que los niveles de trienos conjugados tan sólo mostraron un incremento del 9 % en el mismo período.

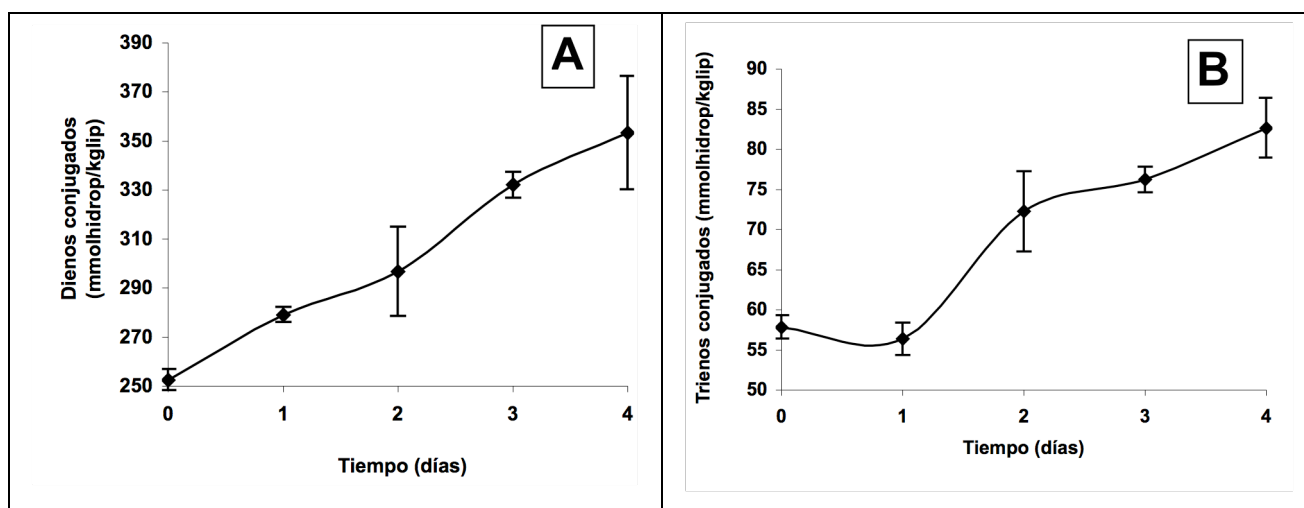


Figura 1.20: Cinética de formación de los dienos (A) y trienos (B) conjugados en leche enriquecida almacenada a 30°C.

	<i>Períodos de inducción (días)</i>	<i>Coefficientes de Pearson</i>	
		Dienos	Trienos
(E,E)-2,4-heptadienal	1,0	0,992	0,969
Hexanal	0,9	0,968	0,964
E-2-hexenal	1,2	0,885	0,927
Butanal	1,0	0,777	0,907
E-2-heptenal	1,1	0,911	0,869
E-2-pentenal	1,2	0,899	0,857
Heptanal	0,9	0,889	0,843

Tabla 1.17: Períodos de inducción en el análisis de los distintos volátiles y correlaciones con las cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados.

2. Mayonesa enriquecida en aceite de pescado

En el experimento llevado a cabo con mayonesa enriquecida en aceite de pescado se detectaron olores asociados a la rancidez en el séptimo día de almacenamiento a 40°C (Tabla 1.18). El análisis sensorial se correlacionó aceptablemente con los tiempos de inducción observados en las cinéticas de la mayoría de los volátiles (Fig. 1.21 y Tabla 1.19). Los períodos de inducción obtenidos en el análisis de los dienos y trienos conjugados fueron respectivamente de 3,0 y 5,2 días (Fig. 1.22). Los períodos de inducción de los volátiles analizados resultaron ser más coincidentes con el obtenido para los trienos que a su vez coincidió con la detección sensorial de la rancidez.

En el caso de la mayonesa enriquecida, los coeficientes de Pearson no alcanzaron los valores obtenidos en la leche pero se pueden considerar aceptables. Las mayores correlaciones correspondieron en este caso al 1-penten-3-ol, 2-etilfurano, E-2-pentenal y propanal (Tabla 1.19).

Al igual que en la leche enriquecida, el análisis de volátiles mostró ser una técnica muy sensible para la detección de la oxidación lipídica. Los valores de área de pico/área de IS mostraron unos incrementos del 126 % y del 213 % para hexanal y 1-penten-3-ol respectivamente mientras que los dienos y trienos conjugados mostraron un incremento en sus valores del 9 % en el mismo período.

<i>Mayonesa enriquecida</i>								
Día	0	1	3	5	7	9	13	17
Análisis sensorial	Sin olor	Sin olor	Sin olor	Sin olor	Incipiente	Incipiente	Rancio	Rancio

Tabla 1.18: Análisis sensorial de mayonesa enriquecida durante su almacenamiento a 40 °C.

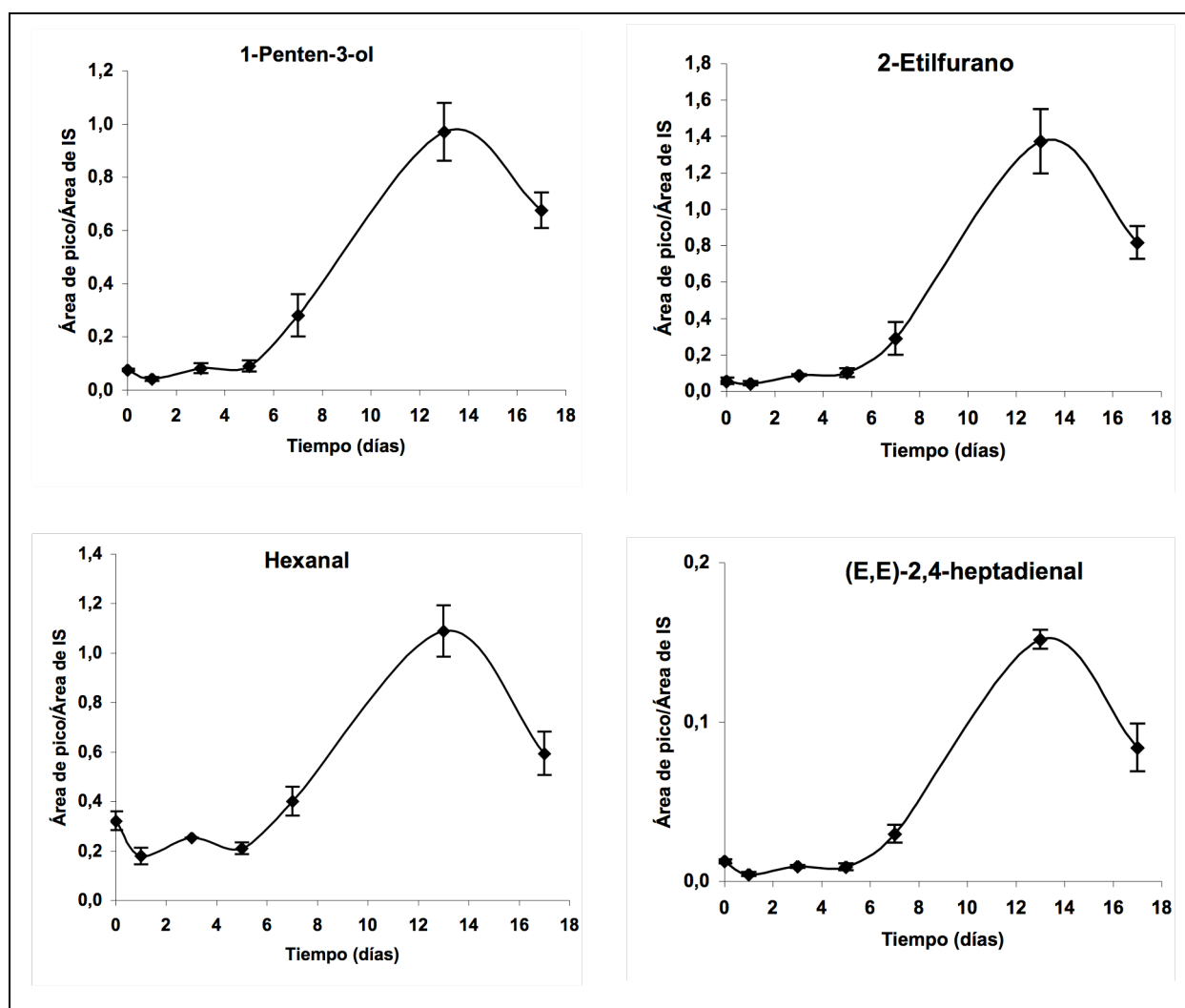


Figura 1.21: Evolución de cuatro de los volátiles analizados en mayonesa enriquecida durante su almacenamiento a 40°C.

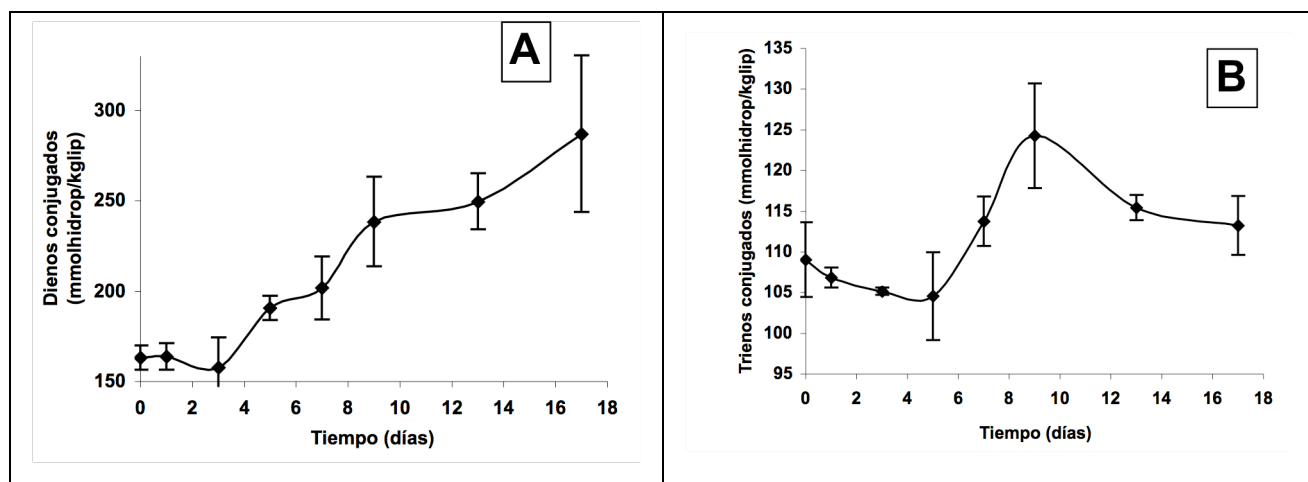


Figura 1.22: Cinética de formación de los dienos (A) y trienos (B) conjugados en mayonesa enriquecida almacenada a 40°C.

	Períodos de inducción (días)	Coeficientes de Pearson	
		Dienes	Trienos
1-Penten-3-ol	5,4	0,876	0,831
2-Etilfurano	6,0	0,834	0,797
E-2-pentenal	5,4	0,819	0,817
Propanal	4,9	0,815	0,822
1-Penten-3-ona	5,2	0,811	0,792
(E,E)-2,4-heptadienal	6,1	0,806	0,798

Tabla 1.19: Períodos de inducción en el análisis de distintos volátiles y correlaciones con las cinéticas de formación de dienos y trienos conjugados.

1.2.4. Conclusiones

En este capítulo se expone el trabajo llevado a cabo para optimizar y validar un método de determinación de compuestos volátiles procedentes de la oxidación lipídica en muestras de emulsiones enriquecidas en aceite de pescado. Los experimentos llevados a cabo en muestras de leche y mayonesa enriquecidas sirvieron para encontrar distintos marcadores del proceso oxidativo entre los volátiles elegidos para llevar a cabo la optimización, obteniéndose buenas correlaciones con los métodos clásicos de seguimiento del deterioro oxidativo, así como con la detección organoléptica de la rancidez.

1.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES PROCEDENTES DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA EN MÚSCULO DE PESCADO

1.3.1. Introducción

Como se ha mencionado previamente, los lípidos presentes en el músculo de pescado, con una alta proporción de PUFAs, son altamente susceptibles a los procesos de oxidación lipídica, lo que provoca una serie de cambios en el olor, el sabor, el color o la textura. Este proceso, que se lleva a cabo mediante mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos, desemboca en la formación de compuestos de bajo peso molecular, volátiles y con un bajo umbral de detección sensorial, que son los responsables de los olores y sabores asociados a la rancidez. La determinación analítica de estos compuestos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante GC acoplada a distintos detectores. La extracción/destilación simultánea con disolventes, es la técnica de extracción utilizada tradicionalmente (Prost, Serot & Demainay, 1998, Varlet, Knockaert, Prost & Serot, 2006). Presenta importantes inconvenientes como son el tiempo necesario para llevar a cabo el análisis o la utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos. Las técnicas de espacio de cabeza tanto estático (SHS) como dinámico (DHS) son más adecuadas debido a su rapidez y selectividad (Alasalvar, Taylor & Shahidi, 2005, Aro, Tahvonon, Koskinen & Kallio, 2003, Frankel, Hu & Tappel, 1989, Girard & Nakai, 1994, Hallier, Serot & Prost, 2004, Medina, Saeed & Howell, 1999, Medina, Satué-Gracia & Frankel, 1999). Las técnicas DHS son, sin duda, las más utilizadas ya que presentan una mayor sensibilidad, pero son complejas y caras y no son adecuadas para el análisis rutinario. La SPME es una buena alternativa ya que además de no necesitar disolventes orgánicos es barata, sensible, selectiva y muy adecuada para el análisis rutinario. La extracción mediante SPME de los volátiles contenidos en el espacio de cabeza de las muestras (HS-SPME) se ha utilizado en muestras de músculo de pescado para evaluar tanto la frescura como para determinar volátiles responsables del olor o sabor de distintas especies, o incluso para diferenciar especies. Algunas aplicaciones recogidas en la bibliografía son la determinación de aminas alifáticas y su relación con la frescura (Li, Zeng, Zhou, Gong, Wang & Chen, 2004), el análisis de la composición volátil de diversas especies (Edirisinghe, Graffham & Taylor, 2007), el estudio de las diferencias entre la fracción volátil de especies frescas y sometidas a ahumado (Guillén & Errecalde, 2002) o la determinación de la composición volátil de pescado almacenado en atmósferas modificadas (Wierda, Fletcher,

Xu & Dufour, 2006).

El objetivo de este capítulo fue optimizar y validar un método de determinación de volátiles formados a partir de procesos de oxidación lipídica en músculo de pescado mediante HS-SPME y GC-MS. El método optimizado fue utilizado para seguir la oxidación lipídica durante el almacenamiento de músculo de pescado picado y refrigerado, con el objetivo de encontrar posibles marcadores del proceso entre los volátiles estudiados.

1.3.2. Experimental

1.3.2.1. Pescado

Para la realización de los experimentos se utilizaron distintos individuos de jurel (*Trachurus trachurus*) adquirido en un mercado local de Vigo que presentó una calidad *extra* de fresca (DOCE, 1989). Una parte de ese jurel se oxidó con el objetivo de generar los volátiles necesarios para llevar a cabo la optimización del método, manteniéndolo a -20°C durante 7 meses. En experimentos posteriores se evaluaron las posibilidades del método optimizado para el seguimiento de la oxidación lipídica en músculo de pescado. Para ello, 8 kg de jurel (20 individuos aproximadamente) fueron eviscerados, el músculo blanco se separó cuidadosamente de la piel y posteriormente fue picado en una trituradora Kitchen Aid. A este músculo se le añadieron 200 ppm (p/p) de sulfato de estreptomicina para inhibir el crecimiento microbiano. Diferentes porciones de 8 g fueron introducidas en matraces Erlenmeyer de 50 mL y se almacenaron a 4 °C durante 5 días. En los distintos períodos de muestreo se recogieron muestras por triplicado para llevar a cabo los análisis. Se calcularon los períodos de inducción de los compuestos formados durante la oxidación como el tiempo (en días) que tardaron las muestras en mostrar un cambio brusco en la cinética de formación de dichos productos. Para su cálculo se utilizó el método de las tangentes a las dos partes de curva cinética (Frankel, 1998).

1.3.2.2. Disolventes, reactivos y gases

- 3-Metil-3-buten-1-ol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Ácido tricloroacético 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Agua Milli-Q ultrapura.
- Cloruro sódico (Aldrich)
- Etanol 95 % (Prolabo, Madrid).
- Helio, Pureza $\geq 99,9999$ % (Air Liquide)
- Hexano (Prolabo, Madrid).
- Sulfato sódico anhidro para análisis 99 % (Prolabo, Madrid).
- Tiosulfato sódico (BDH, Poole, Inglaterra).

1.3.2.3. Patrones

(E,E)-2,4-heptadienal, 1,1,3,3-tetraetoxipropano, 1-octen-3-ol, 1-penten-3-ol, 1-penten-3-ona, 2,3-pentanodiona, 2-etilfurano, 2-pentilfurano, cloruro férrico tetrahidratado, E-2-hexenal, E-2-pentenal, heptanal, hexanal, pentanal, propanal y Z-4-heptenal fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El patrón de ácidos grasos FAME Mix fue adquirido a Supelco (Bellefonte, PA, USA).

1.3.2.4. Materiales

- Centrífuga, GS 6R (Beckman).
- Material de vidrio de uso común en el laboratorio.
- Medidor de pH (Beckman).
- Pipetas (Eppendorf).
- Ultra Turrax T-25 (Ika®).
- Vor Tech (Heidolph).
- Fibras de SPME: Para la optimización de este método se ensayaron cuatro tipos de recubrimientos de SPME. 75 µm de Carboxen-polidimetilsiloxano (**CAR-PDMS**), 2 cm-50/30 µm Carboxen/polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (**CAR-PDMS-DVB**), 65 µm de Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (**PDMS-DVB**) and 65 µm de Carbowax-divinilbenzeno (**CW-DVB**) (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, California, USA).

1.3.2.5. Instrumentación

- Espectrofotómetro Beckman, modelo DU 640 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, USA).
- Equipo de Cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) para la determinación de ácidos grasos. Las condiciones para el análisis de ácidos grasos se resumen en el apartado 1.2.2.2.8 de este capítulo.
- Equipo de Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS) para la detección de volátiles.
 - Cromatógrafo de gases Thermo Finnigan ThermoQuest (San Jose, California) equipado con un inyector split/splitless.
 - Columna cromatográfica DB-1701 (Folsom, California).

- Espectrómetro de Masas Trace (Thermo Finnigan ThermoQuest, San Jose, CA) equipado con un cuadrupolo.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de los volátiles se resumen en la Tabla 1.5. La detección mediante Espectrometría de Masas se llevó a cabo mediante la monitorización de iones previamente seleccionados (modo SIM, single ion monitoring) en las condiciones que se resumen en la Tabla 1.20.

<i>Trace MS Finnigan</i>	
Temperatura interfase	265°C
Temperatura fuente	200°C
Voltaje del Electromultiplicador	500 V
Velocidad de barrido	0,220 s/scan
Modo ionización	Impacto electrónico
Energía de ionización	70 eV
Corriente de emisión	150 µA
Modo de Adquisición	SIM
Intervalo de masas	10-190 m/z

Tabla 1.20: Condiciones instrumentales utilizadas para la determinación de volátiles en músculo de pescado mediante MS.

1.3.2.6. Evaluación de la influencia de los factores volumen de muestra, tiempo de incubación y temperatura de extracción en la eficacia de la HS-SPME. Diseño experimental.

Para evaluar la influencia de los factores tiempo y temperatura de extracción y volumen de muestra se utilizó un diseño factorial completo a dos niveles (2³) con 2 puntos centrales. Los 10 experimentos se realizaron de forma aleatoria. La respuesta evaluada fue el área de pico de cada uno de los analitos. Este diseño fue elegido debido a que proporciona información acerca de los factores que resultan estadísticamente significativos evaluando los efectos de cada factor y las interacciones entre los distintos factores. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el recubrimiento CAR-PDMS, previamente seleccionado, sobre extractos salinos de músculo oxidado de jurel y con agitación. Los datos fueron analizados utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1. Los niveles de cada uno de los factores, mostrados en la Tabla 1.21, dieron lugar a la matriz de experimentos de la Tabla 1.22.

<i>Clave</i>	<i>Factor</i>	<i>Nivel bajo</i>	<i>Nivel alto</i>
Factor A	Cantidad de muestra (mL)	1	6
Factor B	Temperatura de extracción (°C)	40	60
Factor C	Tiempo de extracción (min.)	10	30

Tabla 1.21: Codificación y niveles de los factores seleccionados en el diseño experimental.

Experimento	Cantidad de muestra (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	3,5	50	20
2	1	60	30
3	1	60	10
4	6	40	10
5	3,5	50	20
6	1	40	10
7	6	40	30
8	6	60	30
9	6	60	10
10	1	40	30

Tabla 1.22: Matriz de experiencias generada en el diseño experimental.

1.3.2.7. Extracción de lípidos totales.

1 g de músculo blanco picado se homogeneizó durante 1 minuto, con ayuda de un Ultra Turrax, con 6 mL de metanol y 3 mL de diclorometano. Posteriormente se añadieron 3 mL de diclorometano y 6 mL de agua, y se homogeneizó de nuevo la mezcla durante 1 minuto. La separación de las fases agua/metanol y diclorometano se llevó a cabo mediante centrifugación a 3500 r. p. m. durante 10 minutos. La fase agua/metanol, situada en la parte superior, se recogió con ayuda de una pipeta y fue desechada. La fase de diclorometano, con la grasa presente en el músculo, se secó añadiendo una punta de espátula de sulfato sódico anhidro. El extracto lipídico fue el sustrato empleado para la determinación del contenido total de lípidos, composición de ácidos grasos y para la determinación del índice de peróxidos.

1.3.2.8. Contenido total de grasa

El contenido total de grasa se obtuvo mediante la determinación gravimétrica del residuo seco del extracto lipídico obtenido en la extracción Bligh y Dyer, tal como describen Herbes & Allen (1983). Se pesaron cápsulas de aluminio libres de humedad. Posteriormente, las cápsulas se colocaron en una placa calefactora y en cada una se depositaron 200 µL del extracto lipídico. Tras la evaporación del diclorometano, se dejó enfriar la cápsula con los lípidos en un desecador y se determinaron éstos por diferencia de pesada. El contenido lipídico se expresó como gramos de grasa por cada 100 g de músculo.

1.3.2.9. Análisis de los ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron mediante el método propuesto por Lepage & Roy (1986) a partir del extracto Bligh & Dyer tal y como ha sido descrito en el apartado 1.2.2.2.8. de este capítulo.

1.3.2.10. Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo por un panel formado por 3-4 profesionales entrenados y se realizó siguiendo el baremo indicado en la correspondiente directiva europea (DOCE, 1989), clasificando el olor en cuatro estadios de mayor a menor frescura: fresco, sin olor a fresco, olor rancio incipiente y olor rancio intenso.

1.3.2.11. Índice de peróxidos (PV).

El contenido de peróxidos lipídicos se determinó mediante el método propuesto por Chapman & Mackay (1949). Para ello, una alícuota del extracto de diclorometano obtenido tras la extracción lipídica del músculo (entre 0,1 y 1 mL), se depositó en un tubo de vidrio y el disolvente fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno. La fracción lipídica del músculo fue redisoluelta en 200 µL de hexano y a continuación se añadieron 5 mL de etanol y 0,1 mL de una disolución acuosa de tiocianato amónico al 30 %.

Los blancos se prepararon con 200 µL de hexano, 5 mL de etanol y 200 µL de disolución de tiocianato amónico. En las muestras y en los blancos se añadieron 100 µL de una disolución de 1 mg/mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, en ácido clorhídrico al 3,5 %, preparada diariamente y

conservada en un recipiente opaco. Se midió la absorbancia de las muestras a 500 nm tres minutos después de la adición de hierro ferroso.

La recta de calibrado se preparó con disoluciones acuosas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en el rango 0,8-10 μM .

1.3.2.12. Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para la determinación del índice del ácido tiobarbitúrico, se empleó el método propuesto por Vyncke (1970). 2 g de músculo blanco picado fueron homogeneizados en 10 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Las fases músculo-disolución acuosa fueron separadas mediante centrifugación a 3500 r. p. m. durante 10 minutos y la fase líquida fue filtrada mediante un filtro de papel.

Una alícuota del extracto (0,1-1 mL), dependiendo del grado de oxidación del músculo, fue introducida en un tubo de vidrio y se completó hasta un volumen final de 5 mL con la disolución de ácido TCA al 5 %. A continuación se añadieron a las muestras y a los blancos (con sólo 5 mL de la disolución de TCA), 5 mL de una disolución acuosa de ácido tiobarbitúrico (TBA) de concentración 2,883 mg/mL. La disolución de TBA fue necesario prepararla diariamente y preservarla de la luz. Tras la agitación con ayuda de un vortex, las muestras se incubaron en un baño de agua a 97 °C durante 45 minutos. Por último, tras el enfriamiento de las disoluciones en un baño de agua fría, se midió la absorbancia a 532 nm con ayuda de un espectrofotómetro.

La recta de calibrado se realizó empleando como patrón el 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Este compuesto se hidroliza a malonaldehído (MDA) en medio ácido. Los puntos de la recta se prepararon por adición de alícuotas (10-150 μL) de un patrón acuoso de TEP con una concentración de 0,2 mM en 5 mL de TCA al 5 %. A continuación se añadieron 5 mL de la disolución de TBA y se siguió el procedimiento indicado para las muestras. Los resultados fueron expresados en unidades de μmol de MDA por Kg de músculo.

1.3.2.13. Determinación de volátiles.

El músculo de jurel se separó cuidadosamente de la piel y del músculo rojo y a continuación se picó. El músculo picado se mantuvo en hielo durante toda la preparación de las muestras. 3 g fueron homogeneizados durante 2 minutos con 8 mL de agua Milli-Q u 8 mL de agua Milli-Q saturada en cloruro sódico dependiendo del experimento. Los componentes de la

mezcla resultante fueron separados mediante centrifugación (10 minutos, 3500 r. p. m.) y 6 mL del sobrenadante fueron introducidos en un vial de 20 mL. A continuación se añadieron 50 µL de una disolución acuosa de 3-Metil-3-buten-1-ol para la posterior cuantificación utilizando el método del patrón interno y finalmente se selló el vial con una cápsula de silicona. Las muestras fueron sometidas a la extracción selectiva de los volátiles mediante HS-SPME utilizando el método optimizado a lo largo de este capítulo. Los volátiles fueron adsorbidos sobre una fibra CAR-PDMS incubando la muestra durante 30 minutos a 60 °C. A continuación fueron desorbidos en el inyector de un cromatógrafo de gases (300 °C) durante 10 minutos y tras la separación fueron determinados mediante espectrometría de masas en modo SIM.

1.3.2.14. Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1981) y las medias fueron comparadas por el método de la diferencia de los mínimos cuadrados. Las regresiones lineales fueron evaluadas mediante coeficientes de Pearson. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows, versión 5.1 con la significancia declarada a $p < 0,05$.

1.3.3. Resultados y discusión

1.3.3.1. Optimización del método

1. Pruebas preliminares

Los experimentos previos a la optimización del método fueron enfocados a la detección de los compuestos volátiles presentes en músculo oxidado de jurel. Para ello, los volátiles contenidos en 3 g de esta matriz fueron extraídos mediante la homogeneización con 8 mL de agua Milli-Q. Tras la separación de ambas fases, los analitos fueron extraídos de 1 mL del sobrenadante mediante la técnica HS-SPME utilizando la fibra CAR-PDMS e incubando la muestra a 60°C durante 15 minutos. Finalmente, la fibra fue desorbida en el inyector del cromatógrafo de gases y los volátiles fueron analizados en modo full scan, dando lugar al cromatograma de la Fig. 1.23A. La identificación se llevó a cabo mediante comparación de los espectros de masas con los contenidos en las librerías NIST, Mainlib y Replib además de los espectros y tiempos de retención de patrones inyectados individualmente. 79 compuestos fueron identificados (Tabla 1.23) y 16 de ellos seleccionados para la optimización del método (Tabla 1.24) de acuerdo con estudios previos realizados en músculo de pescado (Aro, Tahvonen, Koskinen & Kallio, 2003, Duflos, Coin, Cornu, Antinelli & Malle, 2006, Frankel, 1998, Josephson & Lindsay, 1987, Kawai, 1996, Sérot, Regost, Prost, Robin & Arzel, 2001).

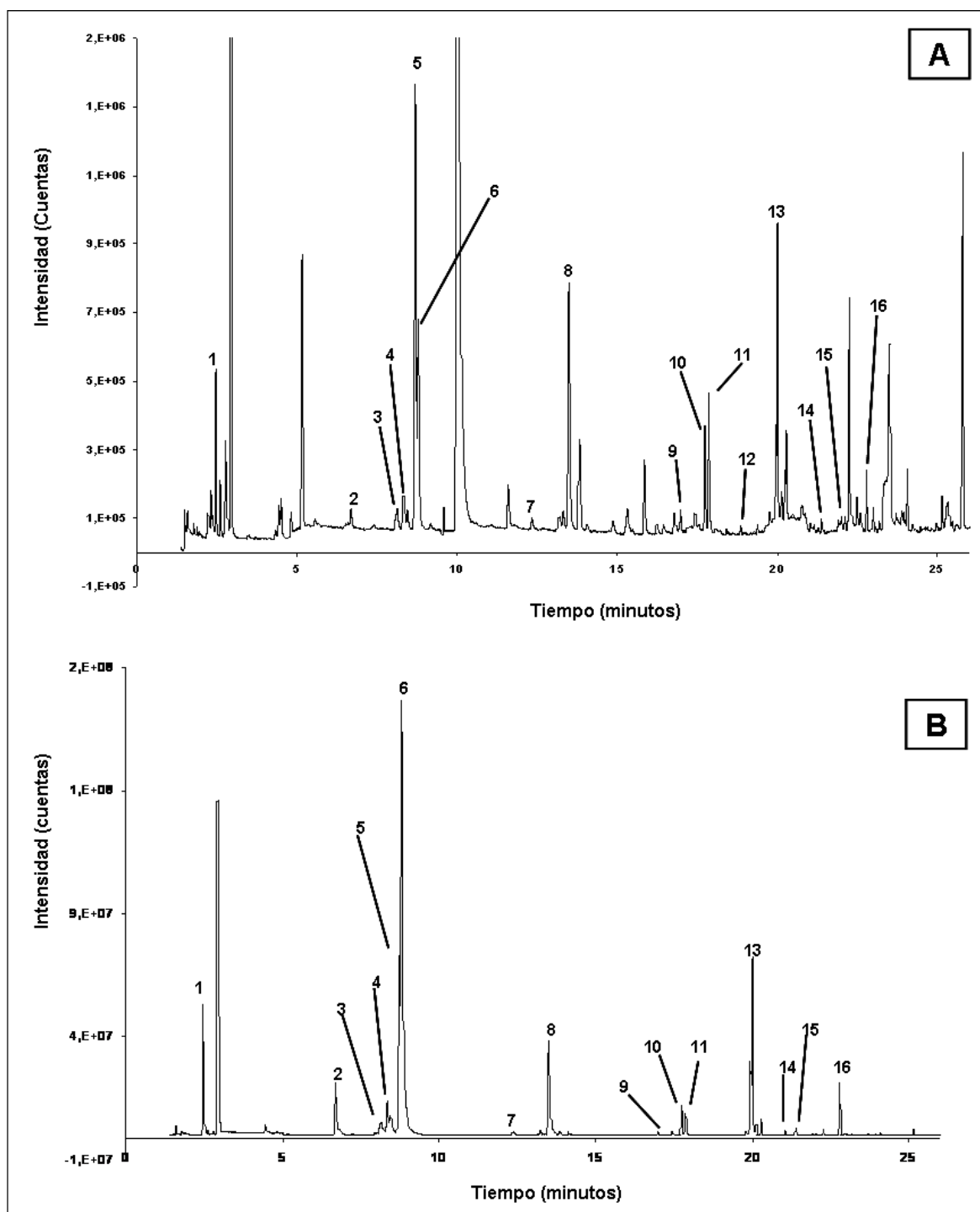


Figura 1.23: Cromatogramas Full scan (A) y SIM (B) obtenidos tras el análisis de una muestra de músculo de jurel oxidado. Los picos están identificados en la Tabla 1.24.

<i>Compuesto</i>	<i>Identificación</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Identificación</i>
Alcoholes		Propilbenzeno	MS
Etanol	MS, STD	Trimetilbenzeno	MS
1-Propanol	MS	Ésteres	
2-Metil-1-propanol	MS	Acetato de etilo	MS, STD
1-Penten-3-ol	MS, STD	Furanos	
1-Pentanol	MS	2-Metilfurano	MS
2-Penten-1-ol	MS	2-Etilfurano	MS, STD
2-Hepten-1-ol	MS	2-Pentilfurano	MS, STD
3-Pentanol	MS	Hidrocarburos no cíclicos	
3-Hexen-1-ol	MS	Pentano	MS, STD
1-Hexanol	MS	3-Metil-1-butenol	MS
4-Heptanol	MS	2-Penteno	MS
1-Octen-3-ol	MS, STD	2-Metil-1,3-pentadieno	MS
1-Octanol	MS	Hexano	MS
2-Octen-1-ol	MS	Octano	MS, STD
2-Nonen-1-ol	MS	1-Octadeceno	MS
Fenol	MS	Pentadecano	MS
Etilalcohol	MS	Eicosano	MS
Aldehídos		5-Eicoseno	MS
Acetaldehído	MS, STD	5-Nonadeceno	MS
Propanal	MS, STD	Nonadecano	MS
2-Metilpropanal	MS	Octadecano	MS
Butanal	MS, STD	Cetonas	
Pentanal	MS, STD	Acetona	MS, STD
E-2-Pentenal	MS, STD	2,3-Butanodiona	MS
Hexanal	MS, STD	2-Pentanona	MS
E-2-Hexenal	MS, STD	1-Penten-3-ona	MS, STD
Heptanal	MS, STD	3-Pentanona	MS
Z-4-Heptenal	MS, STD	2,3-Pentanodiona	MS, STD
E-2-Heptenal	MS, STD	3-Hidroxi-2-butanona	MS
Benzaldehído	MS, STD	3,3-Dimetil-2-butanona	MS
Octanal	MS, STD	2-Hidroxi-3-pentanona	MS
(E,Z)-2,4-Heptadienal	MS	6-Metil-2-heptanona	MS
(E,E)-2,4-Heptadienal	MS, STD	2,3-Octanodiona	MS
Nonanal	MS, STD	6-Octen-2-ona	MS
3,7-Dimetil-6-octenal	MS	2-Nonanona	MS
Decanal	MS	Acetofenona	MS
Aminas		3,5-Octadien-2-ona	MS
Trimetilamina	MS	4-Metil-ciclohexanona	MS
Aromáticos		Compuestos clorados	
Tolueno	MS	Diclorometano	MS, STD
Etilbenzeno	MS	Cloroformo	MS, STD
Xileno	MS	Compuestos sulfurados	
Estireno	MS	Disulfuro de carbono	MS

Tabla 1.23: Volátiles identificados en músculo de jurel oxidado. La identificación se llevó a cabo por comparación con espectros de masas recogidos en librerías (MS) o mediante comparación con los espectros y tiempos de retención de patrones inyectados individualmente (STD).

Los diferentes espectros de masas fueron estudiados con objeto de seleccionar los iones más representativos para trabajar en modo SIM (Tabla 1.24) y así mejorar la especificidad, conseguir la determinación de compuestos no separados cromatográficamente y mejorar la relación señal-ruido (S/R) de los picos.

<i>Número</i>	<i>Nombre</i>	<i>Tr (minutos)</i>	<i>m/z SIM</i>
1	Propanal	2,51	29+57+58
2	2-Etilfurano	6,75	53+81+96
3	1-Penten-3-ona	8,30	27+55+84
4	Pentanal	8,40	29+41+44+57+58
5	1-Penten-3-ol	8,83	57+86
6	2,3-Pentanodiona	8,85	43+100
7	<i>E</i> -2-Pental	12,34	55+83+84
8	Hexanal	13,46	44+56+72+82
9	<i>E</i> -2-Hexenal	17,04	41+55+69+83+98
10	Heptanal	17,78	44+55+70
11	<i>Z</i> -4-Heptenal	17,92	41+55+68
12	2-Pentilfurano	18,94	81+138
13	1-Octen-3-ol	20,04	52+72
14	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	21,05	81+110
15	(<i>E,Z</i>)-2,4-Heptadienal	21,43	81+110
16	3,5-Octadien-2-ona	22,80	81+95+124
IS	3-Metil-3-buten-1-ol (patrón interno)	11,46	43+55+69

Tabla 1.24: Compuestos seleccionados para optimización del método de determinación de volátiles y las relaciones masa/carga (m/z) utilizados para la cuantificación en modo SIM.

Una vez identificados y seleccionados los volátiles para la optimización, se realizó el estudio del efecto memoria de las distintas fibras. Para ello, se analizaron diferentes muestras de músculo oxidado de jurel en las condiciones indicadas anteriormente, desorbiendo los volátiles en el inyector durante 2 minutos. Tras esta primera inyección, las cuatro fibras fueron reinsertadas y se procedió a un nuevo análisis. Ninguno de los compuestos seleccionados fue detectado en estos cromatogramas. Se eligió un tiempo de desorción de 10 minutos con objeto de eliminar posibles sustancias que pudieran permanecer en la fibra y no ser detectadas en los cromatogramas. El incremento del tiempo de desorción entre 2 y 10 minutos no afectó a la resolución de los picos cromatográficos.

2. Selección de la fibra

Las diferentes fibras fueron expuestas durante 15 minutos a 60 °C al espacio de cabeza correspondiente a 1 mL de extracto obtenido a partir de 1 g de músculo oxidado de jurel. Las

temperaturas utilizadas para la desorción fueron: 300 °C para CAR-PDMS, 250 °C para PDMS-DVB, 270 °C para CAR-PDMS-DVB y 220 °C para CW-DVB. En ningún caso se superaron las temperaturas recomendadas en las especificaciones de los distintos recubrimientos, descritas por el fabricante. Las cuatro fibras mostraron resultados muy diferentes en cuanto a sensibilidad. La Fig. 1.24 muestra las áreas relativas obtenidas.

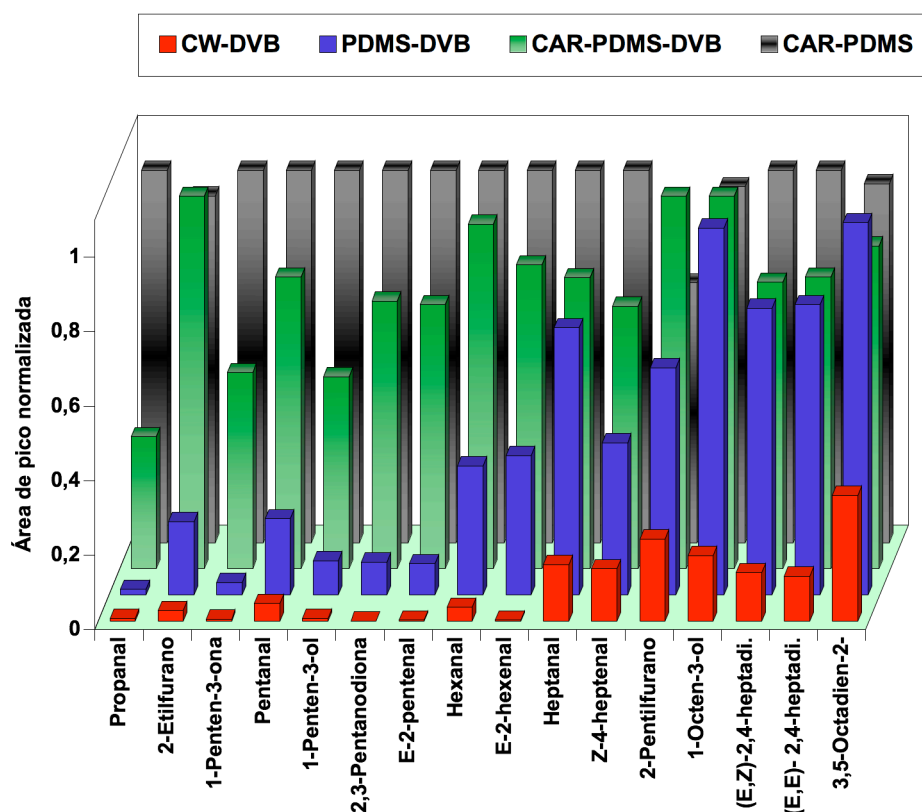


Figura 1.24: Evaluación de las eficiencias obtenidas con los diferentes recubrimientos de SPME testados.

El recubrimiento de CW-DVB fue el menos eficaz en la extracción de los volátiles seleccionados, seguido del PDMS-DVB. Ésta última fibra mostró una mayor sensibilidad a medida que aumentó el peso molecular de los analitos, pero su rendimiento fue menor que el de las fibras CAR-PDMS-DVB o CAR-PDMS. La fibra CAR-PDMS-DVB resultó eficaz en la extracción de estos volátiles, e incluso fue la mejor en la extracción del 2-etilfurano, el 2-pentilfurano o el 1-octen-3-ol. La fibra CAR-PDMS mostró los mejores resultados en la

extracción de la inmensa mayoría de los analitos, especialmente los de menor peso molecular. Por lo tanto, ésta fue la seleccionada para el método propuesto.

3. *Evaluación del efecto salino y agitación del extracto*

Se conoce con el nombre de efecto salino al fenómeno que provoca la disminución de la tendencia de las moléculas dipolares del agua a solvatar a las sustancias polares o parcialmente polares que se encuentran en disolución, al adicionar una sal a una disolución acuosa. En su lugar, las moléculas de agua solvatan los iones de la sal y como consecuencia, disminuye la solubilidad de las sustancias polares o semipolares, facilitando su desplazamiento al espacio de cabeza de la muestra en un proceso de extracción mediante la técnica HS-SPME. La aplicación de agitación a las muestras provoca el incremento de los coeficientes de difusión del analito hacia el espacio de cabeza, disminuyendo el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. La influencia conjunta de estos dos factores fue evaluada mediante la extracción de 3 g de músculo oxidado con agua saturada en NaCl y con agua sin sal. Un volumen de 6 mL de cada uno de los extractos fue sometido a la extracción mediante HS-SPME (fibra CAR-PDMS, a 60°C durante 15 minutos), con y sin agitación. Como muestra la Fig. 1.25, los mejores resultados fueron obtenidos mediante agitación y utilizando extractos salinos.

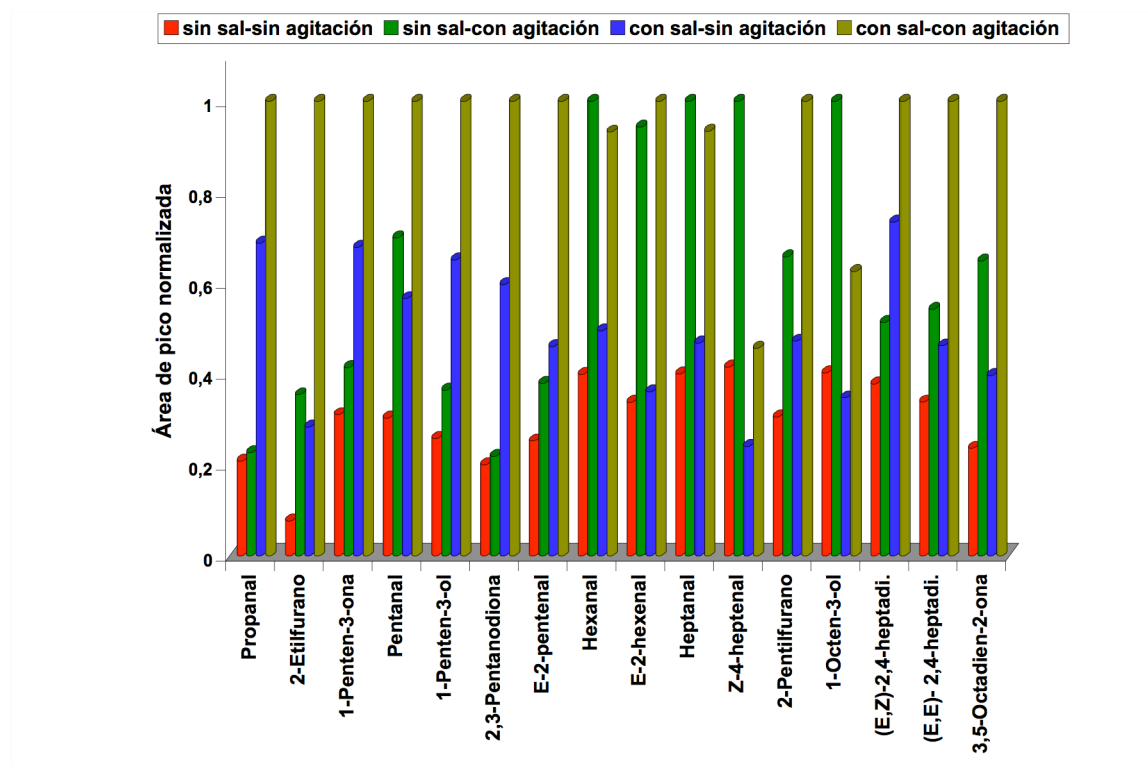


Figura 1.25: Efecto de los factores adición de sal y agitación.

4. Efecto del tiempo y temperatura de incubación y cantidad de muestra. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño factorial completo a dos niveles (2^3) con dos puntos centrales para evaluar la influencia de los factores tiempo y temperatura de extracción y volumen de muestra. La respuesta evaluada fue el área de pico de cada uno de los analitos. Este diseño fue elegido debido a que proporciona información acerca de los factores que resultan estadísticamente significativos evaluando los efectos de cada factor y las interacciones entre los distintos factores. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando el recubrimiento CAR-PDMS, previamente seleccionado, sobre extractos salinos de músculo oxidado de jurel y con agitación.

La Tabla 1.25 muestra las cartas pareto generadas por el programa Statgraphics tras la introducción de las respuestas.

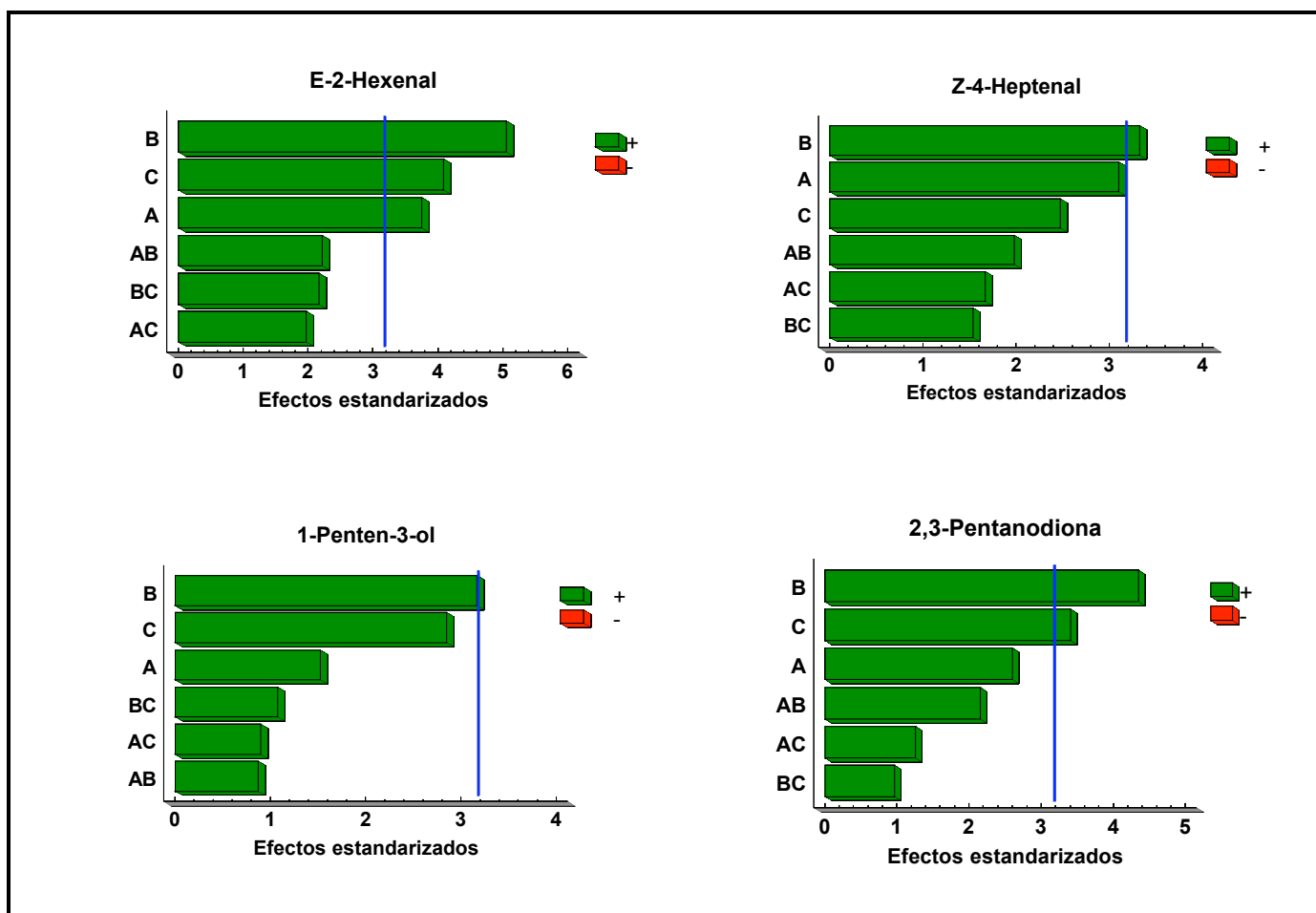


Tabla 1.25: Cartas Pareto obtenidas tras la realización del diseño experimental para algunos de los volátiles estudiados. Los factores representados son Cantidad de muestra (A), Temperatura de extracción (B) y Tiempo de extracción (C).

Para la gran mayoría de los analitos, los tres factores estudiados mostraron un efecto positivo siempre que resultaron significativos. Esto es, la respuesta de pico cromatográfico aumentó al incrementarse el valor de los factores. Las interacciones no fueron significativas para ninguno de los analitos estudiados. A raíz de estos resultados se concluyó que las condiciones experimentales que ofrecieron las mayores áreas de pico fueron la incubación de 6 mL del extracto de músculo de pescado durante 30 minutos a 60 °C.

Debido a que este tipo de diseño sólo evalúa dos niveles por factor, los resultados únicamente proporcionan información acerca de los factores que resultan significativos y no se pueden considerar como optimizados. Las condiciones de incubación de 60 °C durante 30

minutos fueron utilizadas en los siguientes experimentos debido a que son los valores máximos utilizados en el diseño y los factores correspondientes se correlacionan positivamente con la eficacia de la extracción mediante la técnica HS-SPME. Sin embargo, esta eficacia no siempre es proporcional a los valores crecientes de cantidad de muestra. Debido a esto, y teniendo en cuenta que este factor resultó significativo en la extracción de los volátiles, se realizó un estudio más exhaustivo evaluando las respuestas obtenidas tras la extracción de los analitos de 1, 3, 5 y 6 mL de extracto salino Fig. 1.26.

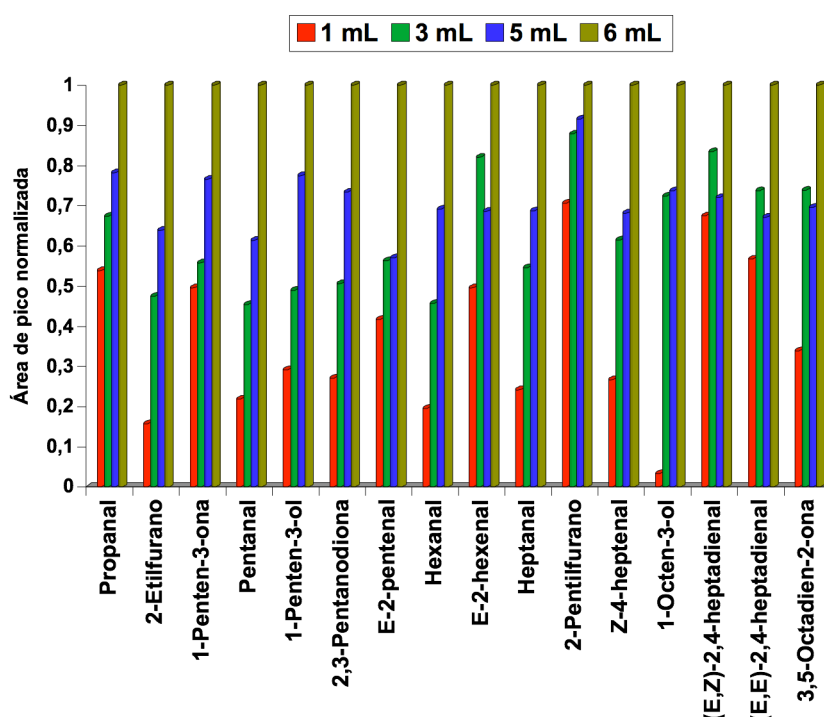


Figura 1.26: Efecto de la extracción de distintos volúmenes de muestra en la eficacia de la HS-SPME.

Como muestra la Figura 1.26, las señales más intensas se consiguieron incrementando la cantidad de muestra hasta 6 mL. Estos resultados son acordes con las bases teóricas generales de la técnica HS-SPME en cuanto a la relación entre cantidad de muestra y eficacia (Górecki & Pawliszyn, 1997) que establecen que se obtiene un mayor rendimiento en la extracción al minimizar el espacio de cabeza. Esta observación contradice los resultados obtenidos en el proceso de HS-SPME para la determinación de volátiles en emulsiones, donde la efectividad resultó mayor al disminuir el volumen de muestra. En este caso, la mayor concentración de analitos provoca interacciones competitivas por los lugares activos de la fibra, disminuyendo la

efectividad de la extracción. Por lo tanto, se establecieron 6 mL de extracto salino como volumen de muestra del método propuesto.

1.3.3.2. Validación

La linealidad del método se investigó en el rango entre 0,2 y 500 ng/mL. La metodología HS-SPME se aplicó sobre diferentes disoluciones de los patrones seleccionados en agua Milli-Q saturada en NaCl. La linealidad resultó satisfactoria ya que se obtuvieron en todos los casos coeficientes de correlación mayores de 0,89 (Tabla 1.26).

Los límites de cuantificación (LOQs) fueron calculados a una relación señal/ruido (S/N) de 10 y estuvieron en el orden de ppb (Tabla 1.26).

La repetibilidad fue estudiada tras el análisis de 6 alícuotas de una misma muestra de músculo oxidado de jurel. Los valores, en términos de desviación estándar relativa, oscilaron entre el 0,6 y el 13,9 % dependiendo del analito.

Una limitación inherente a los análisis utilizando la técnica de SPME es que son muy dependientes de la matriz sobre la que se realizan, por lo que en muchos casos se hace necesaria la utilización del método de adiciones estándar para la cuantificación. Por esta razón se realizó un estudio del efecto matriz evaluando las recuperaciones de cada uno de los volátiles. A diferentes extractos de músculo de jurel se les adicionó una mezcla de volátiles a una concentración final de 100 ng/g. La respuesta obtenida tras la cuantificación fue corregida con las obtenidas tras la cuantificación de los mismos extractos sin adición. Los resultados (Tabla 1.26) mostraron que la eficacia de la extracción no estuvo afectada por la matriz de pescado utilizando una calibración externa para la mayoría de los analitos. Solamente los compuestos 1-penten-3-ona, E-2-hexenal o (E,E)-2,4-heptadienal obtuvieron recuperaciones relativamente bajas por lo que se recomienda su análisis mediante el método de adiciones estándar.

Además de todos estos parámetros de validación, se realizó un test de estabilidad del músculo congelado a -80 °C, para evaluar la posibilidad de almacenamiento de las muestras antes de la realización de los análisis. Para ello se conservaron distintas muestras de músculo de jurel oxidado a -80°C durante 6 meses y el contenido en volátiles fue determinado previa y posteriormente al almacenamiento. Las muestras resultaron estables ya que la mayoría de los analitos mostraron unos coeficientes de variación de entre el 0,6 y el 12,2 % dependiendo del volátil. Únicamente el 2-etilfurano (30,3 %), el E-2-pentenal (20,2 %) y el E-2-hexenal (28,3 %) mostraron unos coeficientes de variación no satisfactorios.

<i>Compuesto</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>	<i>Recuperaciones (%)</i>	<i>LOQs (ng/g músculo)</i>	<i>RSD (%) (n=6)</i>
Propanal	0,999	77,5 ± 6,6	0,34	13,9
2-Etilfurano	0,995	115,8 ± 12,2	0,04	10,5
1-Penten-3-ona	0,996	31,6 ± 1,7	0,05	5,4
Pentanal	0,999	109,7 ± 7,7	0,05	7,0
1-Penten-3-ol	0,999	105,9 ± 7,3	0,13	6,9
2,3-Pentanodiona	0,999	102,8 ± 11,2	0,10	10,9
<i>E</i> -2-Pentenal	0,998	116,9 ± 15,3	0,15	13,1
Hexanal	0,991	103,2 ± 11,3	0,06	11,0
<i>E</i> -2-Hexenal	0,996	66,0 ± 1,3	0,09	2,0
Heptanal	0,992	109,1 ± 5,7	0,04	5,3
<i>Z</i> -4-Heptenal	0,986	93,5 ± 5,0	0,04	5,4
2-Pentilfurano	0,987	93,6 ± 5,1	0,06	4,8
1-Octen-3-ol	0,987	103,3 ± 4,6	0,03	4,5
(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	0,987	59,3 ± 4,8	0,10	4,8
(<i>E,Z</i>)-2,4-heptadienal	—	—	—	0,6
3,5-Octadien-2-ona	—	—	—	8,7

Tabla 1.26: Valores obtenidos en la validación del método. La linealidad, recuperación y límites de cuantificación no fueron evaluados para (*E,Z*)-2,4-heptadienal y para 3,5-octadien-2-ona debido a la carencia de patrones comerciales.

1.3.3.3. Seguimiento de la oxidación lipídica en músculo de pescado mediante el análisis de volátiles.

El método propuesto para la determinación de volátiles fue utilizado para monitorizar la degradación oxidativa durante el almacenamiento refrigerado de músculo picado de jurel. El músculo de jurel utilizado presentó un porcentaje de grasa de un 2,26 %. La composición lipídica se muestra en la Tabla 1.27.

<i>Ácido graso</i>	<i>%</i>	<i>Ácido graso</i>	<i>%</i>
14:0	5,3	20:4-ω6	1,1
15:0	0,5	20:2	0,3
16:0	19,6	20:1-ω9	4,5
16:1-ω7	3,9	22:1-ω11	6,5
17:0	0,6	22:1-ω9	0,6
18:0	4,3	20:4 ω3	0,8
18:1-ω9	10,5	20.5-ω3	8,4
18:1-ω7	2,3	24:1-ω9	1,4
18:2-ω6	1,1	22.5-ω3	2,2
18:3-ω3	1,1	22:6-ω3	23,5
18:4-ω3	1,4		

Tabla 1.27: Composición de ácidos grasos del músculo de jurel.

Durante el transcurso del experimento se observó un fuerte incremento en la concentración de la mayoría de los volátiles tras 2 días de almacenamiento, siendo el propanal, el 1-penten-3-ol, la 2,3-pentanodiona, el hexanal y el 1-octen-3-ol, en este orden, los volátiles que se formaron mayoritariamente. Coincidiendo con este incremento se produjo por primera vez la detección de olores relacionados con la rancidez en el análisis sensorial (Tabla. 1.28).

<i>Día</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Análisis sensorial	Sin olor a rancio	Sin olor a rancio	Olor incipiente a rancio	Olor rancio	Olor rancio	Olor rancio

Tabla 1.28: Análisis sensorial en el experimento de músculo picado de jurel almacenado a 4°C.

La Fig. 1.27 muestra las cinéticas de formación de algunos de los volátiles seleccionados en las que se observa un brusco incremento coincidente con la detección de olores asociados a la rancidez del músculo. Los índices utilizados para monitorizar la oxidación lipídica, PV y TBARS, mostraron unos períodos de inducción de 2,0 y 1,9 días respectivamente (Fig. 1.28).

Como se observa en la Tabla 1.29, para el análisis de la inmensa mayoría de los volátiles seleccionados, las correlaciones fueron mayores con el índice TBARS que con PV. Esto es debido a que tanto el análisis de volátiles como el índice TBARS miden productos secundarios de la oxidación mientras que el índice PV monitoriza la formación de los productos primarios. Las cinéticas de formación de los volátiles 2,3-Pentanodiona, 1-penten-3-ol, 1-octen-3-ol, 1-penten-3-ona y propanal mostraron períodos de inducción muy similares (Tabla 1.29) y fueron

los compuestos que mostraron las mayores correlaciones con los dos índices utilizados para el seguimiento de la oxidación. Por lo tanto, estos 5 compuestos resultaron los mejores marcadores para el seguimiento de la oxidación lipídica en el músculo de jurel.

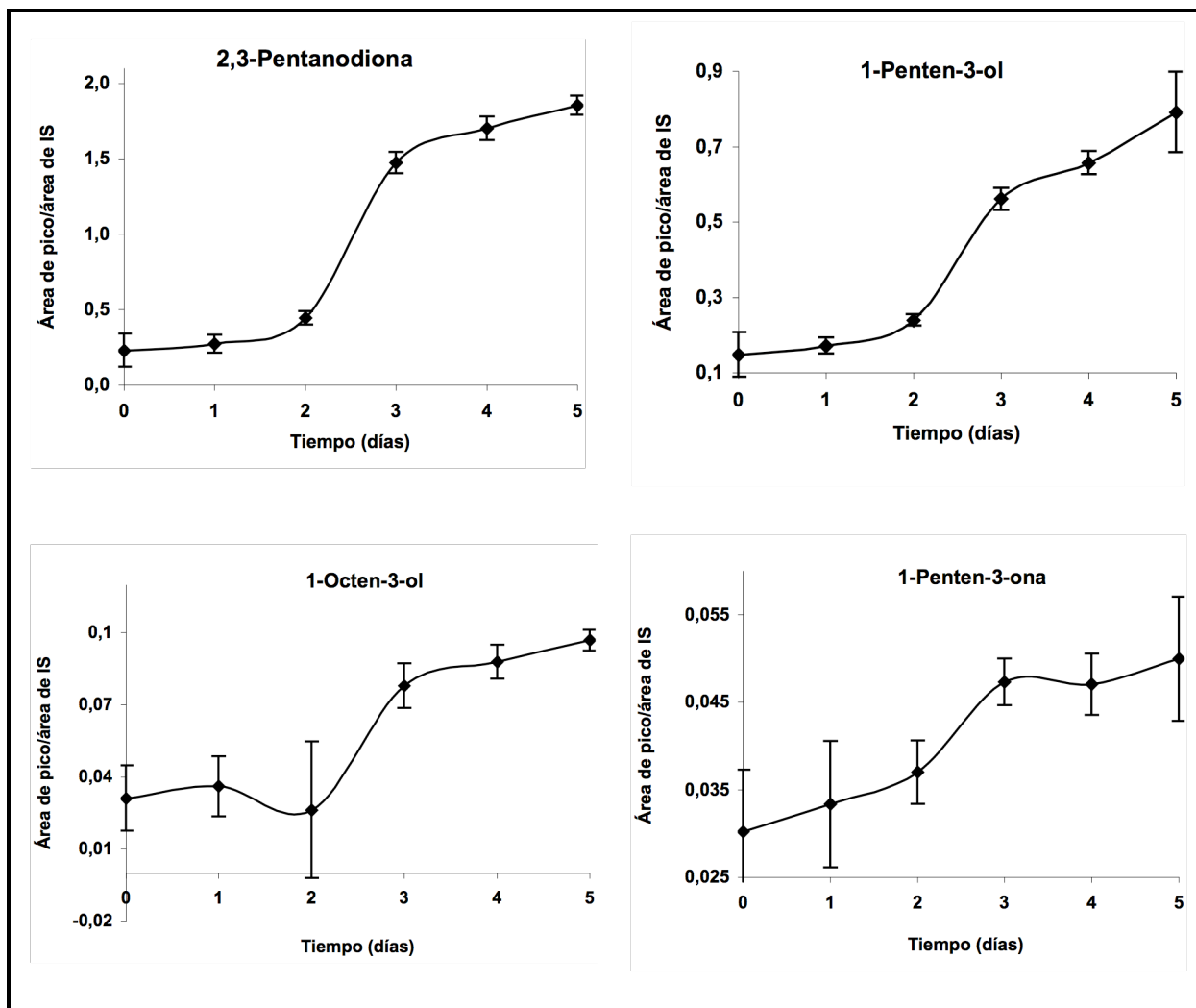


Figura 1.27: Cinética de formación de algunos de los volátiles analizados durante el experimento.

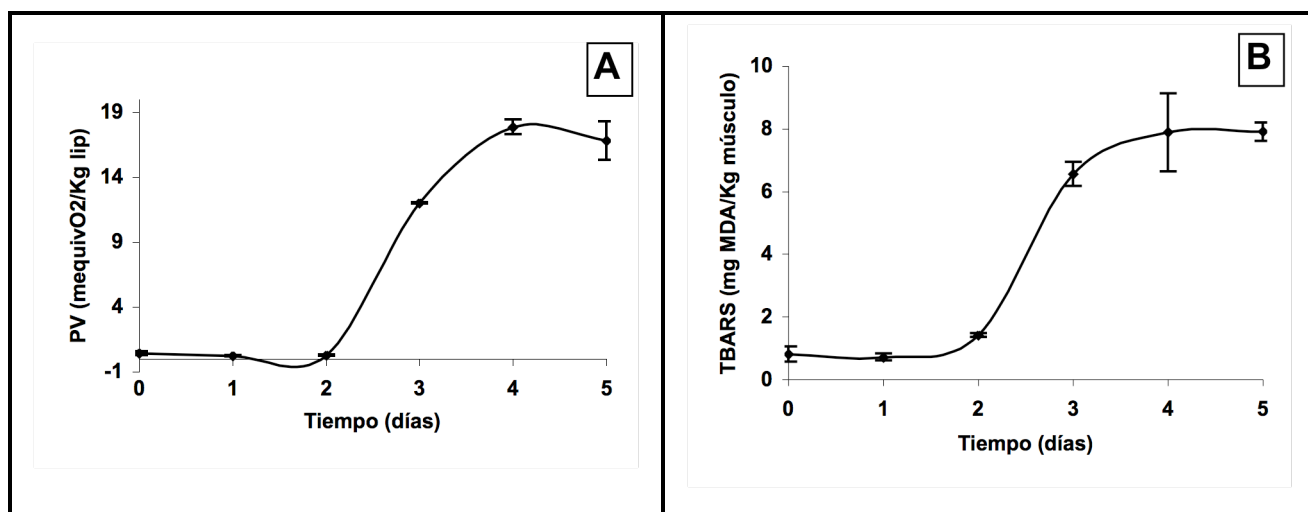


Figura 1.28: Progreso de la oxidación lipídica medido mediante los índices de peróxidos (A) y TBARS (B).

	Períodos de inducción (días)	Coeficientes de Pearson	
		PV	TBA
2,3-Pentanodiona	1,9	0,986	0,997
1-Penten-3-ol	1,9	0,975	0,983
1-Octen-3-ol	2,0	0,985	0,982
1-Penten-3-ona	1,8	0,939	0,969
Propanal	1,8	0,963	0,968

Tabla 1.29: Períodos de inducción obtenidos en el análisis de los distintos volátiles y correlaciones con los índices de seguimiento de la oxidación lipídica.

1.3.4. Conclusiones

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de un método de determinación de compuestos volátiles formados a partir de procesos de oxidación lipídica en músculo de pescado. Para ello se utilizó la técnica HS-SPME para la extracción y concentración de los analitos y la GC-MS para su caracterización y cuantificación. El método demostró ser rápido, sensible, económico y adecuado para la realización de análisis rutinarios. Mediante la monitorización de los distintos volátiles durante el almacenamiento de músculo de jurel refrigerado, se seleccionaron diferentes marcadores del deterioro oxidativo, ya que su cinética de formación se correlacionó con los índices de seguimiento de la oxidación y con la detección sensorial de los olores asociados a la rancidez. La técnica demostró ser una herramienta muy útil presentando varias ventajas con respecto a los índices clásicos de seguimiento del deterioro lipídico. Entre éstas destacan la mayor estabilidad de los analitos, en comparación con los productos primarios de la oxidación, o la excelente correlación con los olores y sabores desagradables asociados a la rancidez, ya que son estos volátiles los responsables de su aparición.

1.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE HS-SPME CON DERIVATIZACIÓN EN FIBRA.

1.4.1. Introducción

En todos los estudios relacionados con la determinación de volátiles en pescado, los compuestos carbonílicos, especialmente los aldehídos, aparecen como el grupo que más contribuye a los aromas característicos del pescado. Esta familia de compuestos también son producidos en mayor o menor medida en la mayoría de los procesos tecnológicos a los que pueden ser sometidos los productos derivados de la pesca como enlatado, cocinado, ahumado, anchoado, salazonado o escabechado (Shahidi, 1998), siendo algunos de ellos responsables de los olores y sabores asociados a este tipo de tratamientos. A la hora de diseñar una estrategia de análisis de carbonilos volátiles en matrices de pescado deben tenerse en cuenta la necesidad de una alta sensibilidad, debido al impacto sensorial que pueden tener este tipo de compuestos a muy bajas concentraciones, o la posibilidad de interferencias debido a la complejidad de la matriz (Stashenko & Martínez, 2004). En este capítulo se presenta la metodología desarrollada para el análisis de compuestos carbonílicos mediante derivatización sobre la superficie de una fibra de SPME. La derivatización antes de su determinación mediante GC es una estrategia apropiada que solventa en gran medida las dificultades anteriormente descritas y la SPME es una técnica de extracción particularmente adecuada para llevar a cabo esta metodología. Entre las ventajas de la derivatización destacan el incremento de la sensibilidad y la selectividad con respecto a la utilización de la técnica de SPME convencional, y la posibilidad de la determinación de carbonilos muy volátiles o polares, cuya separación mediante GC presenta numerosas dificultades. La derivatización se puede llevar a cabo directamente sobre la muestra o sobre la superficie de la fibra (*on fiber*). En el primer caso, el agente derivatizante es añadido sobre un extracto líquido de la matriz sobre la que se lleva a cabo la reacción de derivatización y posteriormente los derivados se extraen con la fibra de SPME y son introducidos en el equipo de medida (Cancho, Ventura & Galceran, 2002). En la derivatización *on fiber*, el agente derivatizante es incorporado sobre la superficie de la fibra y posteriormente se expone a la muestra produciéndose la extracción y derivatización de los analitos simultáneamente (Wang, O'Reilly & Pawliszyn, 2005). Una segunda posibilidad es aquella en la que en primer lugar se extraen los analitos de la fibra y posteriormente se derivatizan sobre la superficie de la misma, exponiendo el

recubrimiento a una disolución del agente derivatizante (Okeyo, Rentz & Snow, 1997). En la bibliografía está descrita la utilización de varios derivatizantes para el análisis de carbonilos en distintas matrices. La 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) es un derivatizante común y versátil ya que las 2,4-dinitrofenilhidrazonas resultantes pueden ser analizadas tanto mediante GC como HPLC. La 2,4,6-triclorofenilhidrazina y la pentafluorofenilhidrazina (PFPH) han sido utilizados en varias matrices biológicas como plantas o aceites vegetales (Gioti, Fiamegos, Skalkos & Stalikas, 2007). Por último, el hidrocloruro de *o*-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA) ha sido sugerido como el derivatizante más adecuado para la determinación de carbonilos de bajo peso molecular. Las oximas formadas tras la derivatización son muy estables térmicamente, lo que supone una ventaja de cara a su determinación mediante GC. El compuesto PFBHA se ha utilizado para la determinación de carbonilos en cerveza (Saison, De Schutter, Delvaux & Delvaux, 2008) o tomates (Deng, Li, Zhu, Qian, Yang & Zhang, 2005) y recientemente para la determinación de formaldehído en muestras de distintas especies de pescado (Bianchi, Careri, Musci & Mangia, 2007).

En este capítulo, se describen los resultados obtenidos tras la optimización y validación de un método de determinación de carbonilos volátiles en muestras de músculo de pescado. Para ello, los analitos fueron extraídos utilizando la técnica HS-SPME y derivatizados sobre la superficie de la fibra, previamente saturada con PFBHA. La metodología desarrollada se utilizó para estudiar la composición de carbonilos volátiles presentes en muestras de varias especies de pescado y relacionar estos resultados con los diferentes tratamientos tecnológicos a los que éstas fueron sometidas y su composición lipídica.

1.4.2. Experimental

1.4.2.1. Muestras de pescado

Para la realización de los distintos experimentos se utilizaron varias especies de pescado, entre ellas, algunas sometidas a tratamientos tecnológicos. Éstas fueron adquiridas en mercados locales de Vigo: Jurel (*Trachurus trachurus*) y trucha (*Salmo trutta*) frescos, merluza (*Merluccius capensis*) en estado congelado, salmón (*Salmo salar*) ahumado y por último anchoa (*Engraulis encrasicolus*). Una parte del jurel se oxidó para generar los volátiles necesarios para llevar a cabo la optimización del método. La oxidación del músculo picado se realizó en el laboratorio manteniéndolo a -20°C durante 7 meses.

1.4.2.2. Disolventes, reactivos y gases

- 2-Metilpentanal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Agua Milli-Q ultrapura.
- Cloruro sódico (Aldrich)
- Helio, Pureza $\geq 99,9999$ % (Air Liquide)
- Hidrocloruro de α -2,3,4,5,6-(pentafluorobenzil)hidroxilamina (PFBHA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)

1.4.2.3. Patrones

(E,E)-2,4-heptadienal, (E,Z)-2,6-nonadienal, 1-penten-3-ona, 2-metil-2-butenal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 5-metilfurfural, acetaldehído, benzaldehído, butanal, E-2-heptenal, E-2-hexenal, E-2-pentenal, fenilacetaldehído, formaldehído, furfural, heptanal, hexanal, metional, nonanal, octanal, pentanal, propanal y Z-4-heptenal fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

1.4.2.4. Materiales

- Centrífuga, GS 6R (Beckman).
- Material de vidrio de uso común en el laboratorio.
- Medidor de pH (Beckman).
- Pipetas (Eppendorf).

- Ultra Turrax T-25 (Ika-Werke GMBH&Co. KG, Staufen, Germany).
- Vor Tech (Heidolph).
- Fibras de SPME. Para la optimización de éste método se testaron cuatro tipos de fibras de SPME: 75 μm de Carboxen-polidimetilsiloxano (**CAR-PDMS**), 2 cm-50/30_μm Carboxen/polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (**CAR-PDMS-DVB**), 65 μm de Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (**PDMS-DVB**) and 65 μm de Carbowax-divinilbenzeno (**CW-DVB**) (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, California, USA).

1.4.2.5. Extracción de volátiles del músculo.

El músculo de pescado se separó cuidadosamente de la piel y a continuación se picó. En el caso de las anchoas enlatadas, fue previamente escurrido para extraer la mayor cantidad de aceite. El músculo picado se mantuvo en hielo durante toda la preparación de las muestras. 0,5 g de músculo se homogeneizaron durante 2 minutos con 5 mL de agua Milli-Q o 5 mL de agua Milli-Q saturada en cloruro sódico. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 3500 r. p. m. Una alícuota del sobrenadante se introdujo en un vial de 20 mL que posteriormente se selló con una cápsula de silicona para ser sometida a la extracción y derivatización selectiva de los volátiles mediante HS-SPME.

1.4.2.6. Extracción y derivatización en la superficie de la fibra.

La metodología utilizada para la extracción-derivatización simultánea de los compuestos carbonílicos se basó en la publicada por Bianchi, Careri, Corradini, Musci & Mangia (2005) con algunas modificaciones. En primer lugar se llevó a cabo la saturación del recubrimiento de la fibra por el agente derivatizante. Para ello, 2 mL de una disolución de PFBHA (10 mg/mL) fueron introducidos en un vial de espacio de cabeza de 20 mL que fue sellado con un séptum de silicona (Fig. 1.29). La fibra de SPME fue expuesta al espacio de cabeza de esta disolución durante 10 minutos a 60 °C con agitación. Por último, la fibra saturada fue expuesta al espacio de cabeza de los extractos del músculo y las oximas formadas tras la reacción entre los analitos y la PFBHA fueron desorbidas en el inyector del GC (Fig. 1.29).

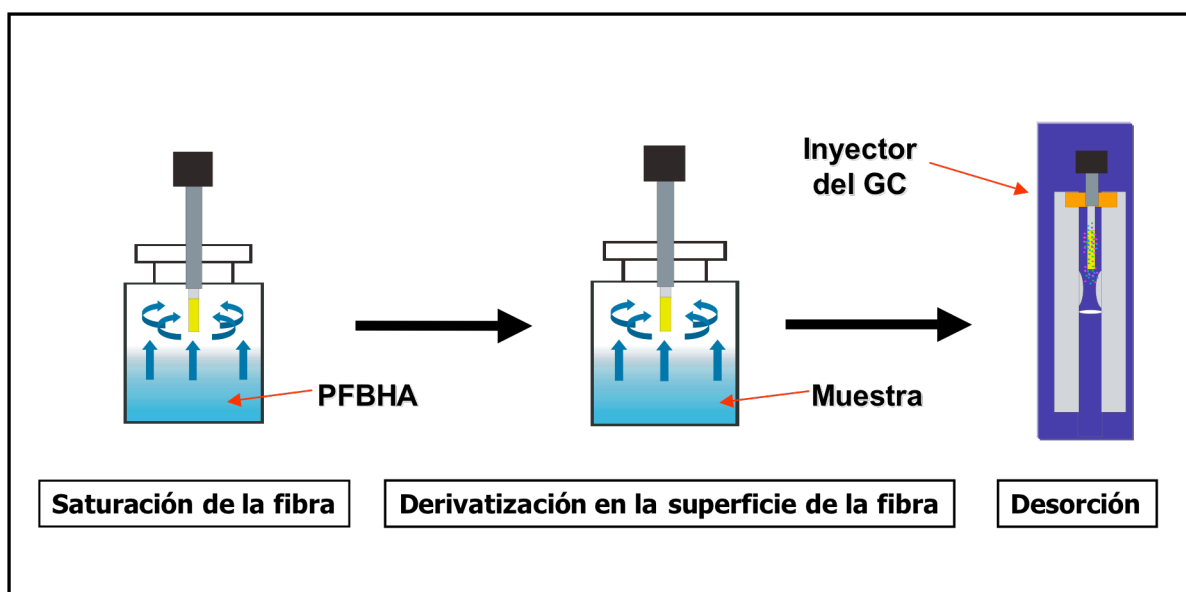


Figura 1.29: Metodología utilizada para la determinación de carbonilos mediante derivatización en fibra con PFBHA.

La determinación analítica se llevó a cabo mediante GC-MS utilizando un cromatógrafo Thermo Finnigan ThermoQuest (San Jose, California) con un inyector split/splitless, acoplado a un Espectrómetro de Masas Trace (Thermo Finnigan ThermoQuest, San Jose, CA) equipado con un cuadrupolo

Las condiciones en las que se llevó a cabo el análisis se resumen en la Tabla 1.30.

<i>GC Thermo Finnigan</i>		<i>Trace MS Finnigan</i>	
Inyector	Split/Splitless	Temperatura interfase	265°C
Modo de inyección	Splitless (1 minuto)	Temperatura fuente	200°C
Temperatura	250°C	Voltaje del Electromultiplicador	500 V
Flujo	1,5 mL/min	Velocidad de barrido	0,220 s/scan
Flujo de split	45 mL/min	Modo ionización	Impacto electrónico
Columna	DB-1701	Energía de ionización	70 eV
Fase	(14 %-Cianopropil-fenil)-metilpolisiloxano	Corriente de emisión	150 µA
Dimensiones	30 m x 0,32 mm x 1 µm	Modo de Adquisición	SIM
Gas portador	Helio	Intervalo de masas en full scan	35-500 m/z
Programa de temperaturas			
Temperatura inicial	70°C (1 min)		
Rampa 1	10°C/min (hasta 100°C)		
Rampa 2	20°C/min (hasta 250°C)		
Temperatura final	250 °C (5 min)		

Tabla 1.30: Condiciones instrumentales utilizadas para la determinación de carbonilos en músculo de pescado.

1.4.2.7. Extracción de lípidos totales.

Para extracción de los lípidos del músculo de pescado se siguió la metodología propuesta por Bligh & Dyer (1959) descrita en el apartado 1.3.2.7. de este capítulo. El extracto lipídico se empleó para la determinación del contenido total de lípidos y la composición de ácidos.

1.4.2.8. Contenido total de grasa

El contenido total de grasa se obtuvo mediante la determinación gravimétrica del residuo seco del extracto lipídico obtenido en la extracción Bligh & Dyer, según la metodología utilizada por Herbes & Allen (1983) y descrita en el apartado 1.3.2.8 de este capítulo. El contenido lipídico se expresó como gramos de grasa por cada 100 g de músculo.

1.4.2.9. Análisis de los ácidos grasos

Los ácidos grasos se determinaron mediante el método propuesto por Lepage & Roy (1986) basado en la metilación de los ácidos grasos y la posterior determinación mediante GC-FID, siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.2.2.2.8. del presente capítulo.

1.4.2.10. Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1981) y las medias fueron comparadas por el método de la diferencia de los mínimos cuadrados. Las regresiones lineales fueron evaluadas mediante coeficientes de Pearson. La significancia fue declarada a $p < 0,05$.

1.4.3. Resultados y discusión

1.4.3.1. Optimización del método

1. Pruebas preliminares

Para conseguir una correcta separación de los distintos carbonilos derivatizados con objeto de llevar a cabo la optimización, se plantearon una serie de experimentos utilizando disoluciones patrón individuales y derivatizándolos sobre la superficie de una fibra CAR-PDMS. De esta forma, se determinaron los tiempos de retención de las distintas oximas y se obtuvieron los espectros de masas, que se muestran en el Anexo I de este capítulo, para la posterior identificación de los picos cromatográficos en las muestras. Para la mayoría de los carbonilos no simétricos se obtuvieron dos picos correspondientes a los dos isómeros (E y Z) formados tras la reacción de derivatización (Fig. 1.30). Para los compuestos E-2-hexenal, heptanal, octanal y nonanal, estos dos picos no pudieron ser cromatográficamente resueltos.

El ión de $m/z=181$, correspondiente con la pérdida del residuo pentafluorobencil, fue el pico base para todos los compuestos excepto para el formaldehído ($m/z=196$). Tras el análisis de los espectros, se seleccionaron los iones que se muestran en la Tabla 1.31 para la cuantificación de los analitos en modo SIM. Estos iones, distintos del pico base, fueron elegidos debido a la mejor relación señal/ruido obtenida y porque permitieron la determinación de compuestos no resueltos cromatográficamente. Los volátiles mostrados en la Tabla 1.31 fueron seleccionados debido a que son responsables de muchos de los olores característicos del pescado fresco o sometido a diferentes tratamientos tecnológicos (Shahidi, 1998). 14 de estos compuestos se emplearon como representativos para optimizar el procedimiento (volátiles 1-14 en Tabla 1.31), ya que han sido asociados a los aromas típicos del pescado (Shahidi, 1998).

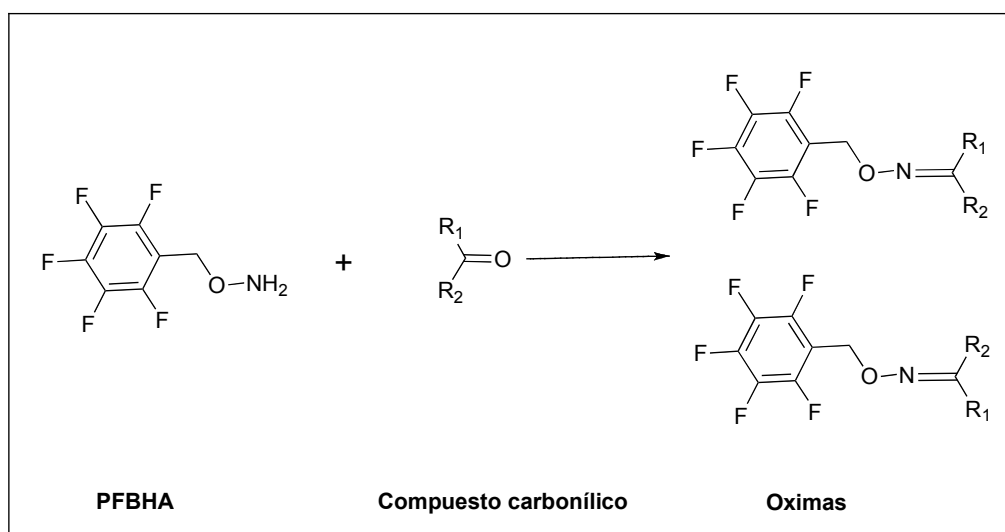


Figura 1.30: Formación de oximas tras la reacción entre un carbonilo y el derivatizante PFBHA.

En las Figuras 1.31 y 1.32 se muestran los cromatogramas obtenidos en modo full scan y SIM de una muestra de músculo oxidado de jurel. La identificación de los picos se corresponde con la descripción de la Tabla 1.31. Como se puede observar, tanto la selectividad como la forma de los picos correspondientes a cada oxima, además de la relación s/n, fueron notablemente mejoradas mediante la utilización del modo SIM. Como un ejemplo, las relaciones s/n obtenidas para el compuesto 1-penten-3-ona en una muestra de músculo de jurel oxidado fueron 2 y 5041 en modo full scan y SIM respectivamente.

	<i>Nombre del compuesto</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>	<i>SIM m/z</i>
1	Acetaldehído	7,21+7,28	209
2	Propanal	7,88+7,94	236
3	Butanal	8,55+8,61	239
4	1-Penten-3-ona	8,86+8,98	278+279
5	Pentanal	9,22+9,26	239
6	<i>E</i> -2-pentenal	9,73+9,76	250
7	Hexanal	9,86+9,89	239
8	<i>E</i> -2-hexenal	10,36	250
9	Heptanal	10,46+10,49	239
10	<i>Z</i> -4-heptenal	10,74+10,76	279
11	<i>E</i> -2-heptenal	10,92+10,95	250
12	Octanal	11,05	239
13	(<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal	11,46+11,50	276
14	Nonanal	11,61	239
15	Formaldehído	6,38	195
16	2-Metilbutanal	8,80+8,83	239
17	3-Metilbutanal	8,93+8,98	239
18	2-Metil-2-butenal	9,73	264
18	Furfural	10,40+10,54	291
19	5-Metilfurfural	11,03+11,08	305
20	Metional	11,12+11,15	252+299
21	Benzaldehído	11,56+11,60	301
22	Fenilacetaldehído	11,89+11,94	91
23	(<i>E,Z</i>)-2,6-	12,12+12,19	69
Patrón	2-Metilpentanal	9,45+9,50	253

Tabla 1.31: Tiempos de retención e iones seleccionados (m/z) en la cuantificación de los distintos carbonilos.

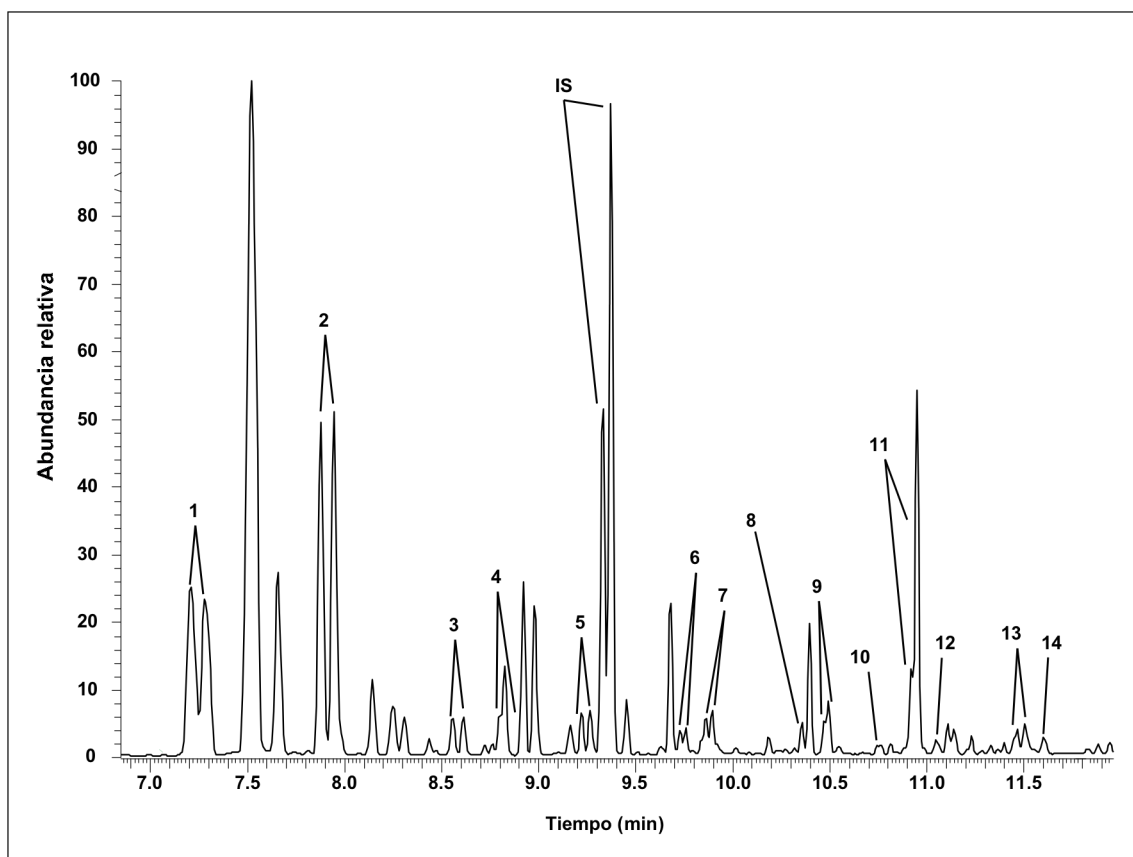
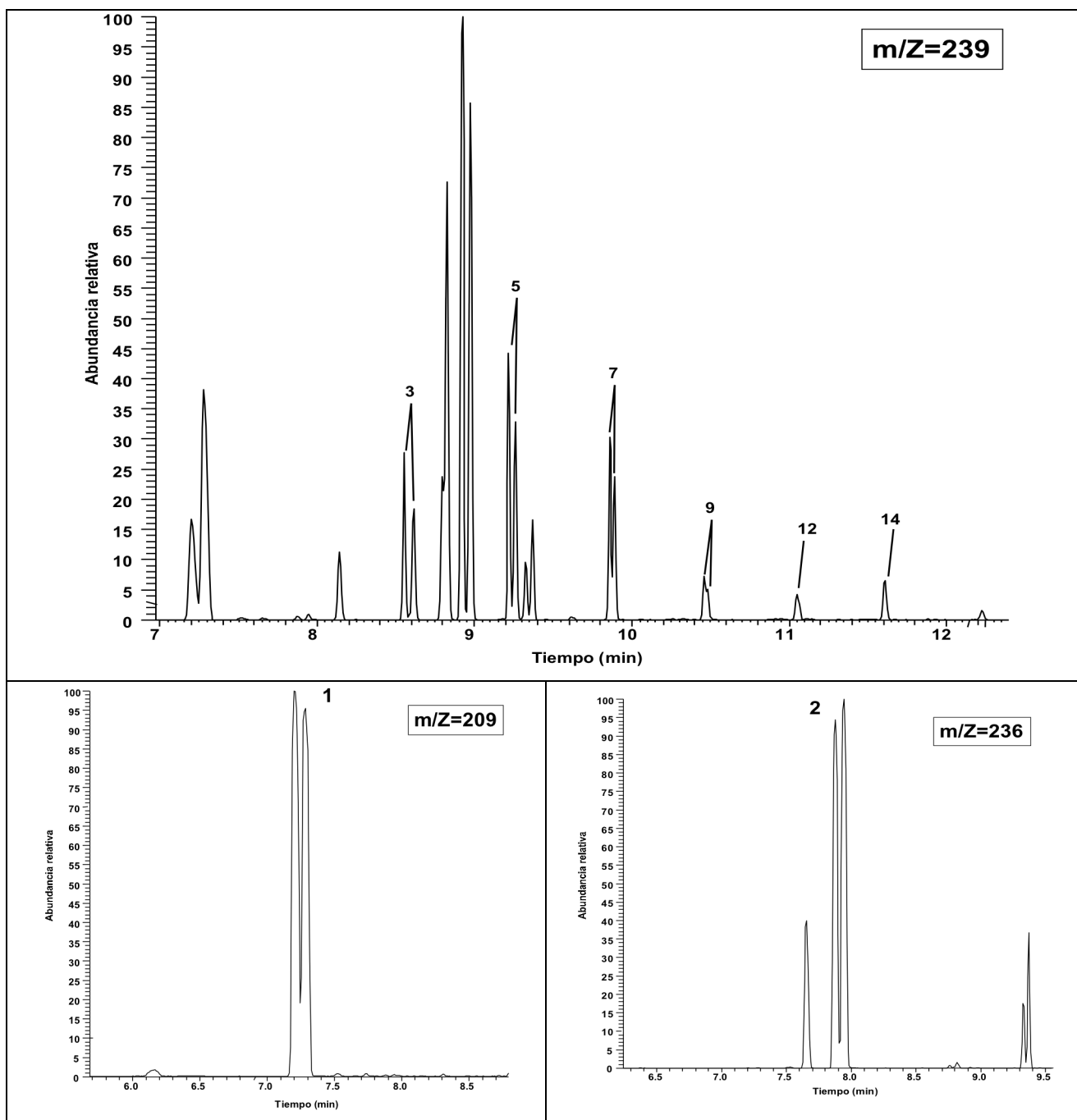


Figura 1.31: Cromatograma en modo full scan obtenido tras el análisis de una muestra de jurel oxidado. Los números se refieren a los compuestos identificados según la Tabla 1.31.



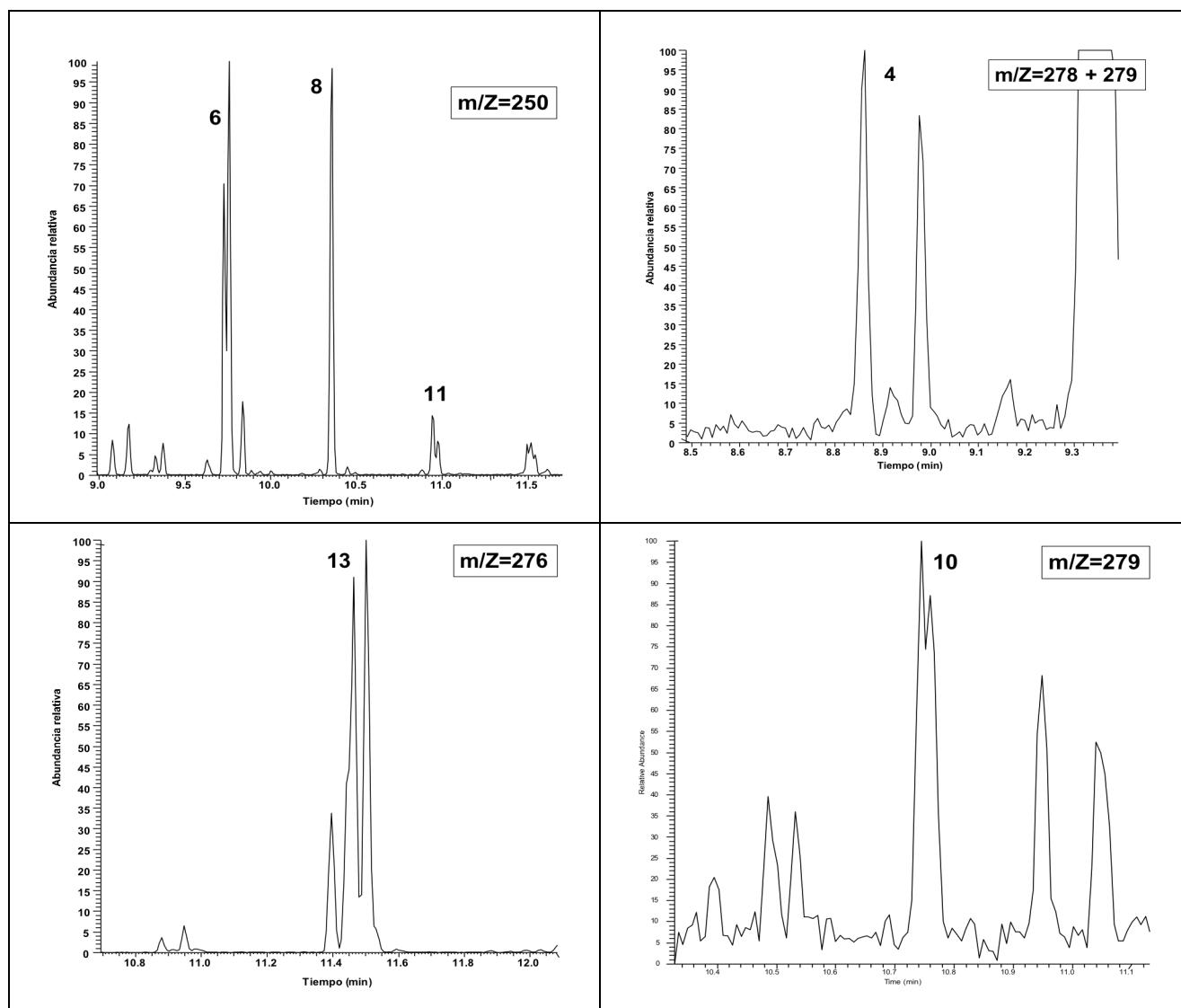


Figura 1.32: Registro en modo SIM obtenido en una muestra de jurel oxidado para los distintos compuestos seleccionados en la optimización del método. Los números se refieren a los compuestos identificados según la Tabla 1.31.

2. Recubrimiento de la fibra y parámetros de desorción

Se probó la eficacia de cuatro fibras de SPME en términos de sensibilidad y selectividad en la extracción/derivatización de los compuestos carbonílicos seleccionados: CAR-PDMS, CAR-PDMS-DVB, PDMS-DVB y CW-DVB. Estas fibras fueron elegidas debido a que han sido utilizadas en varios trabajos para la determinación de carbonilos en distintas matrices tras su derivatización con PFBHA (Bianchi, Careri, Musci & Mangia, 2007, Cancho, Ventura &

Galceran, 2002, Martos & Pawliszyn, 1998a, Martos & Pawliszyn, 1998b). Los diferentes recubrimientos, previamente saturados con el derivatizante, se expusieron al espacio de cabeza de 3 mL de un extracto salino de músculo oxidado de jurel. La desorción en el inyector se llevó a cabo durante 4 minutos a distintas temperaturas dependiendo del recubrimiento, de acuerdo a las recomendaciones técnicas especificadas por el fabricante para cada fibra: 300 °C para CAR-PDMS, 260 °C para PDMS-DVB, 270 °C para CAR-PDMS-DVB y 220 °C para CW-DVB. Como muestra la Fig. 1.33, la mayor eficacia en la extracción se obtuvo utilizando las fibras CAR-PDMS-DVB y PDMS-DVB. Para los aldehídos lineales la fibra PDMS-DVB mostró áreas de pico mayores que el recubrimiento CAR-PDMS-DVB, excepto en el caso de los aldehídos de menor peso molecular (acetaldehído y propanal), mientras que para los restantes analitos las diferencias fueron menores utilizando uno u otro recubrimiento. Tan sólo el *E*-2-pentenal y el (*E,E*)-2,4-heptadienal mostraron mejores resultados en términos de sensibilidad con la CAR-PDMS. Por lo tanto, la fibra PDMS-DVB fue la seleccionada para continuar la optimización del método.

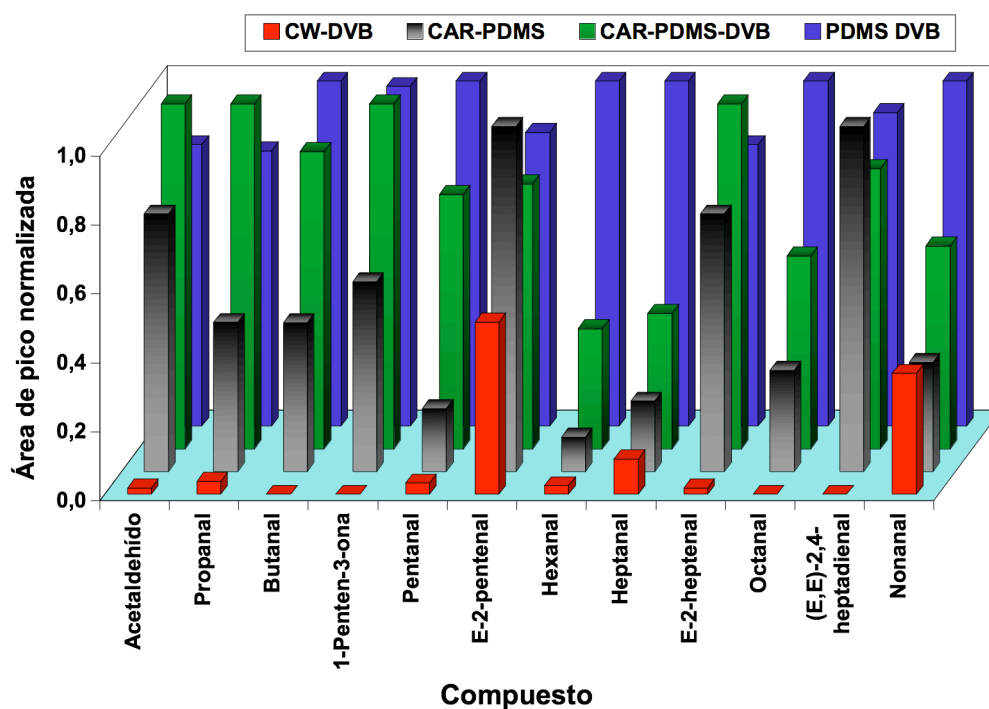


Figura 1.33: Eficacia de las distintas fibras para la extracción/derivatización de los compuesto carbonílicos seleccionados.

Además de la elección del tipo de fibra, se estudió la posibilidad de la existencia del efecto memoria de los distintos recubrimientos. Para ello, los carbonilos procedentes de una muestra de músculo oxidado de jurel fueron extraídos y derivatizados según la metodología descrita anteriormente. Tras una primera desorción durante dos minutos, se llevó a cabo una segunda y se comprobó que ninguna de las oximas aparecía en este segundo cromatograma. Finalmente, se seleccionó un tiempo de desorción de 4 minutos para eliminar compuestos que pudieran quedar atrapados en el recubrimiento y no ser detectados en el cromatograma, sin que ese incremento afectara a la resolución de los picos cromatográficos.

Existe la posibilidad de que los inyectores de los GC no estén calentados uniformemente y por lo tanto, la posición de la fibra en la etapa de desorción, puede resultar un factor importante desde el punto de vista de la sensibilidad. Para evaluar este parámetro se realizó el análisis de tres alícuotas del mismo extracto de músculo oxidado de jurel con la fibra PDMS-DVB variando la profundidad de la fibra en el inyector entre 2 y 4 cm. Como muestra la Fig. 1.34, se encontraron diferencias entre las áreas obtenidas en las tres posiciones para la mayoría de los analitos. Las oximas procedentes de propanal, E-2-pentenal, hexanal, heptanal y (E,E)-2,4-heptadienal mostraron la mayor dependencia con este parámetro y, en todos los casos, la mayor sensibilidad fue obtenida tras introducir la fibra 4 cm en el inyector del cromatógrafo. Por lo tanto esta fue la posición elegida para llevar a cabo los restantes experimentos.

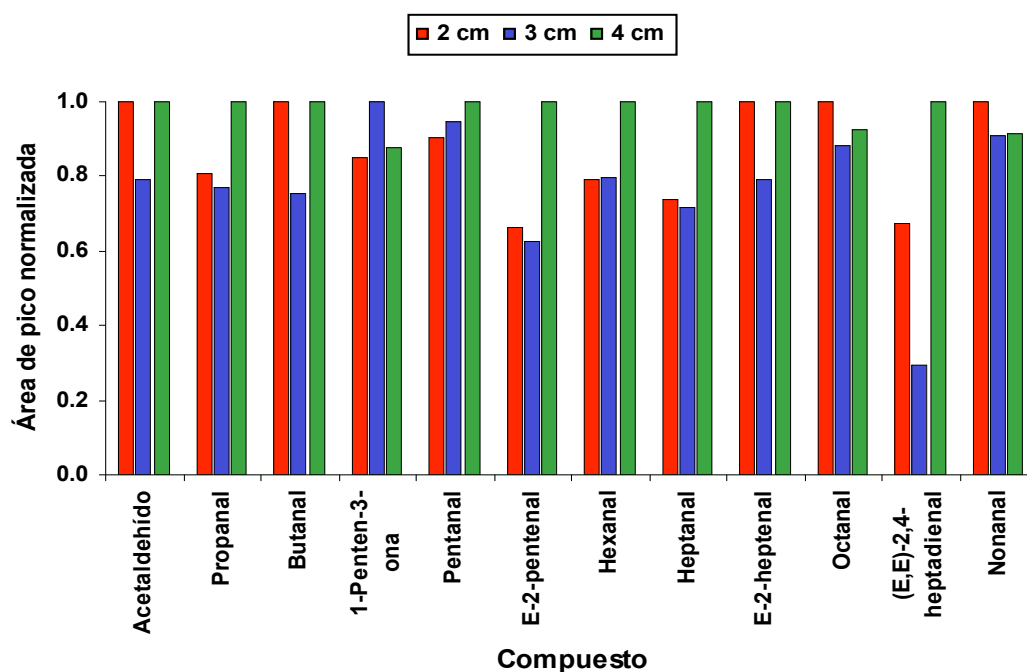


Figura 1.34: Influencia de la posición de la fibra en el inyector en la eficacia de desorción de los analitos.

3. Efecto salino y agitación

Para evaluar el efecto de la presencia de sal en el extracto se extrajeron los volátiles de 0,5 g de músculo oxidado de jurel con agua Milli-Q y agua Milli-Q saturada en NaCl. A continuación se llevó a cabo la extracción de los analitos contenidos en 3 mL de cada uno de los extractos con la fibra PDMS-DVB a 60 °C durante 15 minutos. Como se observa en la Fig. 1.35, se produjo un incremento en la eficacia cuando la extracción del músculo se llevó a cabo con agua saturada en NaCl. El aumento de la difusión de los analitos al espacio de cabeza tras la adición de la sal explica ese incremento en la sensibilidad.

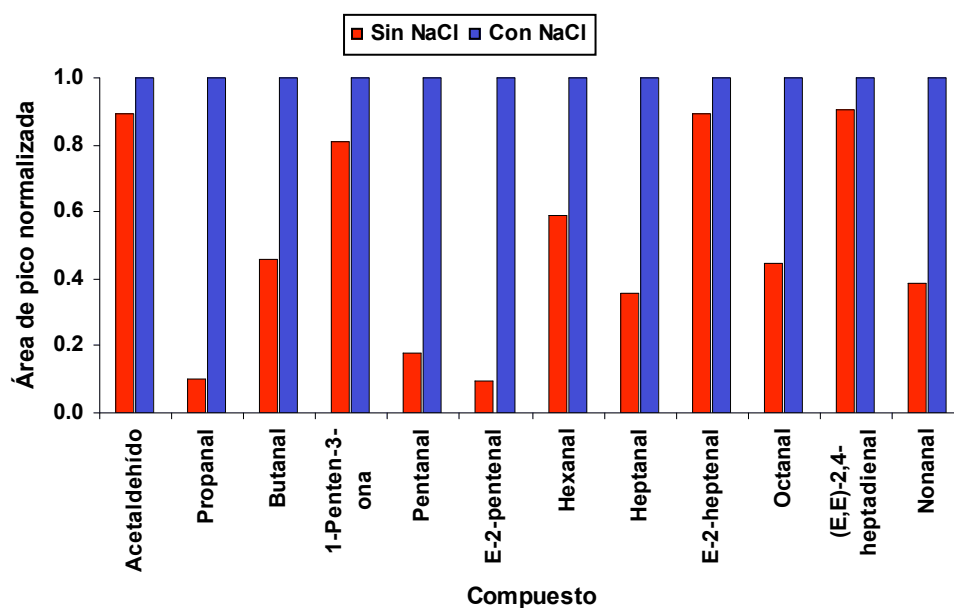


Figura 1.35: Evaluación del efecto salino.

El efecto de la agitación fue evaluado con extractos salinos en las condiciones indicadas anteriormente. Para todos los carbonilos, este factor tuvo una influencia positiva en la eficacia de la extracción, debido a que la agitación facilitó su difusión al espacio de cabeza, reduciendo el tiempo necesario para alcanzar la máxima extracción. A la vista de estos resultados se decidió efectuar los análisis extrayendo los carbonilos del músculo homogeneizando las muestras con agua saturada en sal y realizando el proceso de HS-SPME con agitación de los extractos.

4. Tiempo de incubación.

La influencia del tiempo de extracción/derivatización sobre la eficacia de la extracción, fue evaluada entre 10 y 30 minutos en extractos de 3 mL de músculo de jurel en las condiciones fijadas anteriormente. A medida que aumenta el tiempo de exposición, aumenta la concentración de analitos en la fibra y la respuesta hasta alcanzar el equilibrio entre las distintas fases. Una vez en el equilibrio, la respuesta permanece constante aún incrementando el tiempo de exposición. Estos mismos resultados fueron observados en nuestro experimento, como muestra la Fig. 1.36, donde la señal se incrementó hasta aproximadamente 25 minutos para la mayoría de los carbonilos. Para otros, el tiempo de equilibrio no se alcanzó en los 30 minutos fijados como máximo en este experimento. Debido a que uno de los objetivos de este trabajo fue conseguir un

método rápido para el análisis de un número elevado de muestras, se fijó el tiempo de extracción en 25 minutos asumiendo la pérdida de eficacia en la extracción/derivatización de compuestos como 1-penten-3-ona, pentanal u octanal.

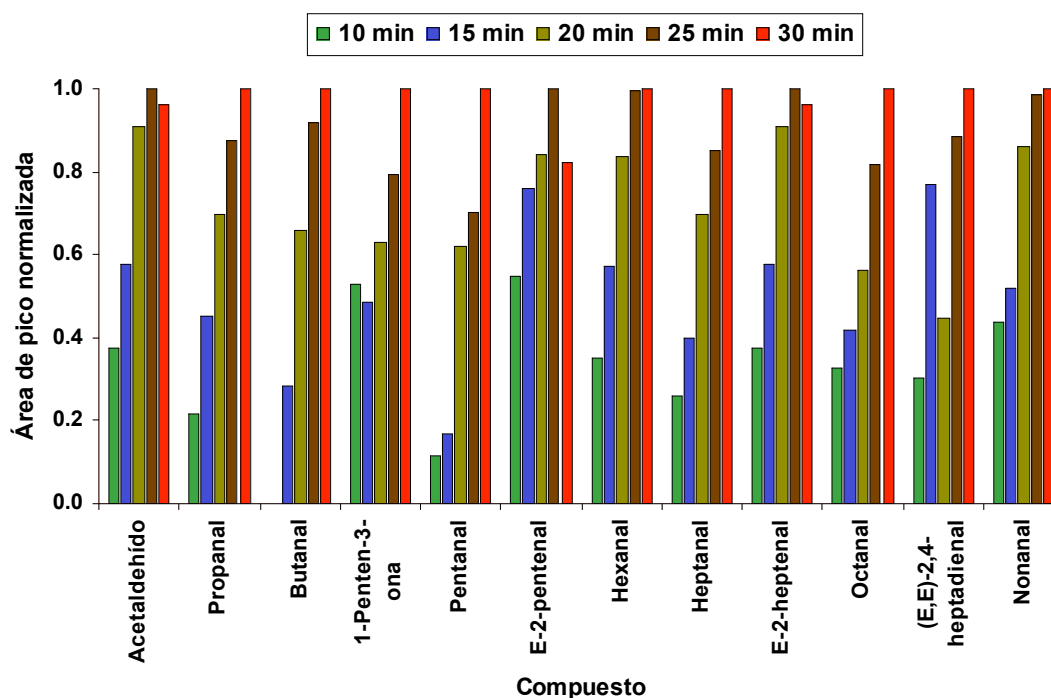


Figura 1.36: Cinética de extracción/derivatización a 60°C.

5. Temperatura de incubación.

La temperatura de extracción/derivatización es un factor importante en la optimización del método ya que además de afectar a la transferencia de los analitos al espacio de cabeza, influye considerablemente en el rendimiento de la reacción de derivatización (Gioti, Fiamegos, Skalkos & Stalikas, 2007). Su influencia fue estudiada en el rango entre los 40 y los 60 °C en extractos de 3 mL de muestra en las condiciones optimizadas hasta este momento. La temperatura máxima fue fijada para evitar posibles oxidaciones de los lípidos del músculo contenidos en el extracto. Como muestra la Fig. 1.37 el incremento de temperatura tuvo un efecto positivo en la eficacia del método para todos los analitos, especialmente entre los 50 y 60 °C, por lo que fue esta última la temperatura seleccionada.

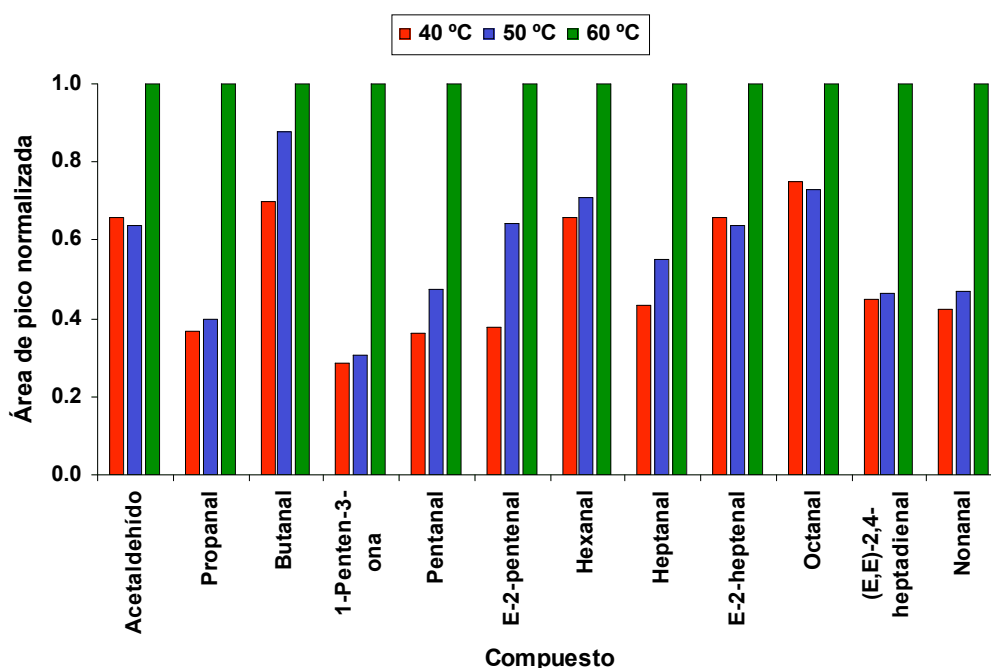


Figura 1.37: Efecto de la temperatura de extracción/derivatización.

6. Volumen de muestra

La influencia del volumen de muestra en la eficacia de la extracción se estudió mediante un experimento comparativo con tres alícuotas del mismo extracto de músculo oxidado de jurel de 1, 2, y 3 mL en las condiciones fijadas anteriormente. Como muestra la Fig. 1.38 el incremento de volumen y, por tanto, la disminución del espacio de cabeza de los extractos, produjo mayores señales para todos los analitos y, por lo tanto, 3 mL fue el valor fijado para este parámetro. Como ha sido descrito por Górecki & Pawliszyn (1997), la mayor eficacia utilizando la técnica HS-SPME, se consigue minimizando el volumen de espacio de cabeza, lo que se consigue aumentando la cantidad de muestra, en este caso, de extracto procedente de músculo de pescado. El incremento de la efectividad con el aumento de la cantidad de muestra también fue observada en la determinación de volátiles procedentes de la oxidación en músculo de pescado (Capítulo 1, apartado 1.3.3.1.4.). Sin embargo, como se observó en la determinación de volátiles en emulsiones (Capítulo 1, apartado 1.2.3.1.3.), en muestras con altas concentraciones de analito la efectividad se ve disminuida al incrementar el volumen de muestra. Esto es debido a que una gran concentración en el espacio de cabeza incrementa la competitividad por los lugares activos de la fibra reduciendo la eficacia de extracción (Kanavouras, Kiritsakis & Hernandez, 2005).

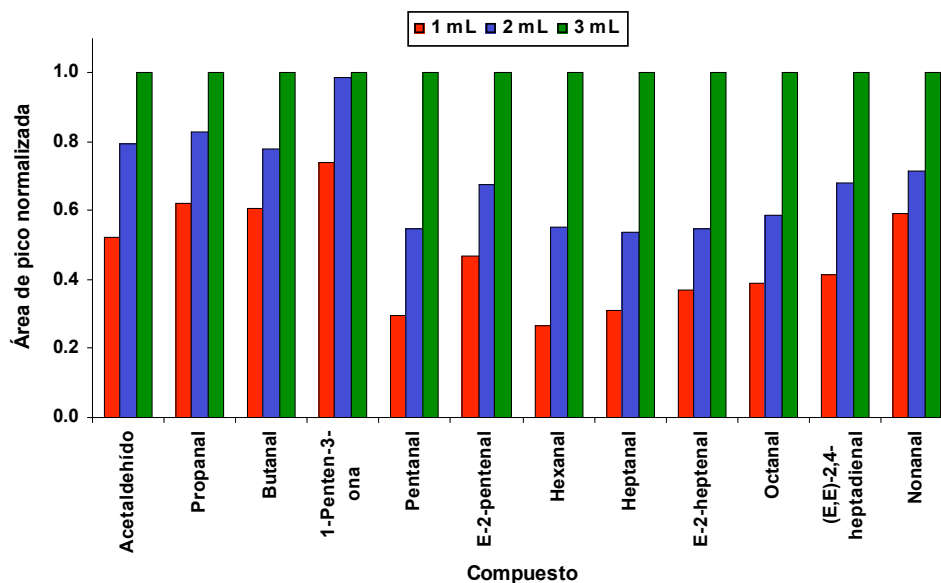


Figura 1.38: Efecto del volumen de extracto en la eficacia de la extracción/derivatización.

1.4.3.2. Validación

En las condiciones de trabajo optimizadas anteriormente se llevó a cabo una calibración multinivel (6 niveles) adicionando distintas concentraciones de los compuestos utilizados para la validación en agua Milli-Q saturada en NaCl en un intervalo entre 0,2 y 50 ng/mL. Dado que se utilizó el método del patrón interno para la cuantificación de las muestras, se adicionó a todos los patrones una disolución de 2-metilpentanal en una concentración final de 10 ng/mL. Los datos de cada calibrado se sometieron a un análisis de regresión lineal y los coeficientes de correlación obtenidos en dicho análisis se muestran en la Tabla 1.32 junto con el rango de linealidad para cada uno de los analitos. Para la mayoría de los volátiles, la linealidad no se mantuvo en todo el rango de concentraciones ensayado, probablemente debido a la saturación del derivatizante al incrementar las concentraciones de los analitos. Sin embargo, se pudo fijar un rango en el que la mayoría de los compuestos mostraron una relación lineal entre la concentración y la señal obtenida ya que en todos los casos los coeficientes de correlación superaron valores de 0,99.

Los límites de cuantificación se calcularon como la concentración correspondiente a una señal analítica 10 veces superior al ruido de fondo y mostraron valores muy aceptables para

las concentraciones de los analitos que se pueden encontrar en músculo de pescado (del orden de ppb) (Tabla 1.32).

Para estudiar la repetibilidad del procedimiento analítico en las condiciones fijadas, se realizaron en el mismo día 6 extracciones consecutivas de otras tantas alícuotas de un mismo extracto de músculo oxidado de jurel, con adición de 2-metilpentanal como patrón interno. Los valores de la repetibilidad en términos de RSD se consideraron en todos los casos satisfactorios ya que en ningún caso superaron el 11,3 % (Tabla 1.32).

La reproducibilidad fue evaluada analizando diariamente músculo de jurel conservado a -30 °C durante 8 días. Los valores obtenidos estuvieron en el rango entre el 7,0 y el 16,7 % dependiendo del compuesto (Tabla 1.32).

Las recuperaciones fueron calculadas usando extractos salinos de músculo fresco de jurel a los que se les añadió una mezcla de los analitos estudiados en una concentración de 10 ng/g. Las respuestas obtenidas fueron corregidas con las obtenidas tras el análisis de las muestras sin adición. Los valores fueron muy satisfactorios (Tabla 1.32) ya que tan solo hexanal y E-2-heptenal mostraron recuperaciones inferiores al 80 %, probablemente debido a un ligero efecto matriz en la cuantificación de ambos analitos.

<i>Compuesto</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>	<i>Rango lineal (ng/mL extracto)</i>	<i>Recuperaciones (%)</i>	<i>LOQs (pg/g musculo)</i>	<i>Repetibilidad RSD (% n=6)</i>	<i>Reproducibilidad RSD (% n=8)</i>
Acetaldehído	0,9984	0,2-20	83,4	0,014	3,8	7,0
Propanal	0,9996	0,2-50	86,1	0,011	6,8	9,6
Butanal	0,9999	0,2-10	95,9	0,012	8,9	16,4
1-Penten-3-ona	0,9997	0,2-50	85,2	0,030	11,3	9,6
Pentanal	0,9999	0,2-50	93,8	0,010	3,0	15,6
E-2-pentenal	0,9974	0,2-40	88,7	0,056	8,6	15,1
Hexanal	0,9997	0,2-50	78,7	0,009	2,3	15,0
E-2-hexenal	0,9988	0,2-15	83,9	0,010	2,8	7,9
Heptanal	0,9996	0,2-10	98,5	0,009	2,8	10,9
Z-4-heptenal	0,9989	0,2-50	91,4	0,009	9,0	16,7
E-2-heptenal	0,9991	0,2-10	71,3	0,012	6,2	12,6
Octanal	0,9997	0,2-10	90,1	0,011	8,7	10,8
(E,E)-2,4-heptadienal	0,9994	0,2-20	102,3	0,007	8,0	8,3
Nonanal	0,9994	0,2-10	89,0	0,006	10,2	15,5

Tabla 1.32: Valores obtenidos en los distintos parámetros de validación del método.

1.4.3.3. Aplicación a la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de pescado de distintas especies y sometidas a diferentes tratamientos tecnológicos.

Una vez optimizadas las condiciones y realizado el estudio de la validación, el método desarrollado se aplicó a la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de músculo de pescado de varias especies sometidas a distintos tratamientos tecnológicos. Las muestras fueron dos especies de pescado fresco (jurel y trucha), una muestra de pescado congelado (merluza), una muestra de pescado ahumado (salmón) y una muestra de pescado sometida a un proceso de anchoado (anchoa). La composición lipídica se expone en la Tabla 1.33.

	<i>Anchoa</i>	<i>Jurel</i>	<i>Merluza</i>	<i>Salmón</i>	<i>Trucha</i>
Composición de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales)					
14:0	0,9	4,8	5,0	3,6	2,3
16:0	14,3	20,2	19,0	13,7	17,4
16:1n7	1,1	3,4	6,0	3,3	2,6
18:0	3,7	5,4	3,2	3,3	3,7
18:1n9	60,8	9,9	16,3	39,8	9,2
18:1n7	1,9	2,4	3,4	2,8	2,0
18:2n6	5,2	1,0	1,4	7,9	11,0
18:3n3	0,6	0,9	1,1	2,8	1,7
20:1n9	0,9	4,4	5,9	3,7	0,5
18:4n3	0,2	1,1	2,9	0,7	0,6
20:4n6	0,2	1,3	1,0	0,5	0,8
22:1n11	1,0	6,0	2,6	3,2	0,1
22:1n9	0,2	0,7	0,8	0,6	0,0
20:4n3	0,1	0,7	1,3	0,8	0,7
20:5n3	1,0	8,5	9,5	3,8	8,9
24:1n9	0,4	0,9	1,2	0,5	0,5
22:5n3	0,3	2,4	1,7	2,0	3,7
22:6n3	7,3	24,7	17,5	6,7	34,0
Contenido lipídico (% grasa total en músculo)					
% LIP	14,5	1,7	1,4	11,6	1,6

Tabla 1.33: Composición lipídica de las muestras analizadas.

Estas mismas muestras fueron analizadas con el método optimizado en el Capítulo 1.3. para la determinación de compuestos volátiles en muestras de músculo de pescado mediante HS-SPME sin derivatización y los resultados fueron comparados. Además de los analitos utilizados en la optimización y validación del método, se llevo a cabo el estudio de los niveles de los restantes compuestos listados en la Tabla 1.31 ya que han sido descritos en la bibliografía como importantes contribuyentes a las características organolépticas de las especies de pescado procesadas (Shahidi, 1998).

La comparación entre los cromatogramas obtenidos tras la determinación de los carbonilos de una muestra de salmón ahumado con ambos métodos (Fig. 1.39) mostró como la derivatización de los carbonilos generalmente proporcionó una mayor sensibilidad e incluso una mejor forma del pico cromatográfico y esta tendencia se vio reflejada en el análisis de las demás especies.

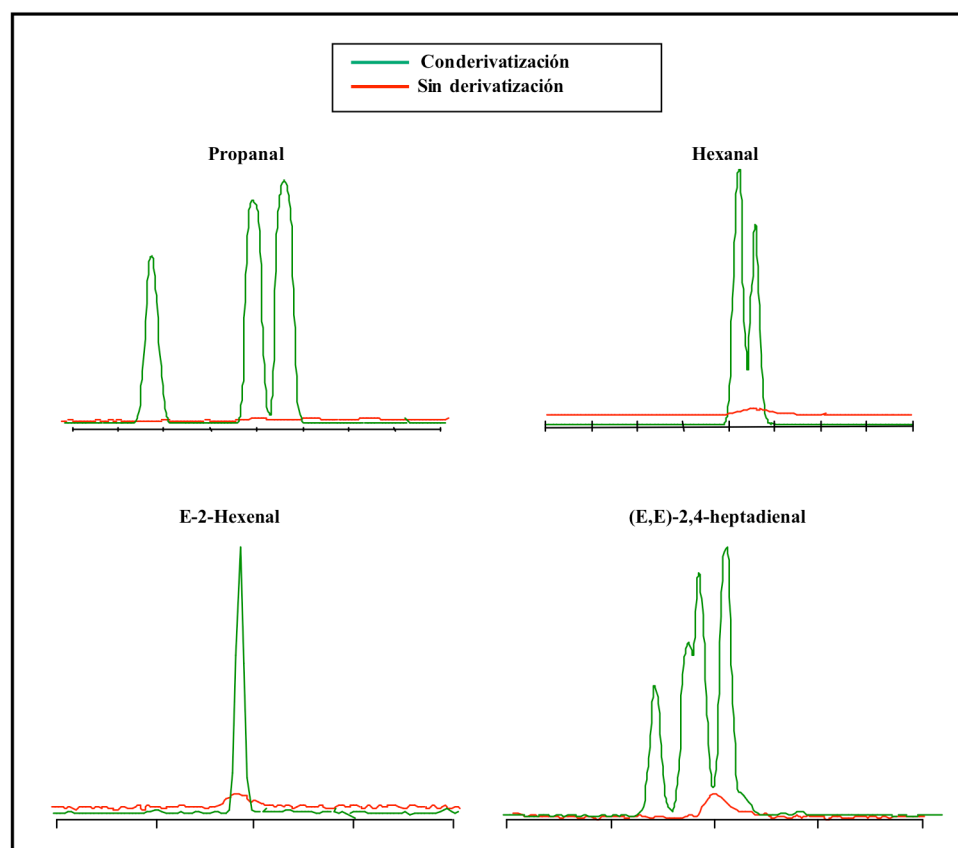


Figura 1.39: Comparativa de cromatogramas obtenidos tras el análisis de una muestra de salmón ahumado con ambos HS-SPME métodos: con y sin derivatización.

Mediante la utilización de la metodología con derivatización se observó un incremento notable en la sensibilidad, para la inmensa mayoría de los analitos (Fig. 1.40). El Z-4-heptenal y la 1-penten-3-ona constituyeron las únicas excepciones ya que las respuestas obtenidas fueron mayores utilizando la metodología clásica sin derivatización. Este hecho pudo ser debido a que la reacción entre el agente derivatizante y estos analitos fue menos eficiente debido a las

interacciones estéricas derivadas de la configuración *cis* del Z-4-heptenal o de la presencia de dos grupos adyacentes al grupo carbonilo en la cetona. El formaldehído únicamente pudo ser detectado tras la derivatización con PFBHA ya que resultó ser un analito demasiado volátil, que no pudo ser suficientemente retenido en la columna cromatográfica y coeluyó con el agua adsorbida sobre la fibra de SPME.

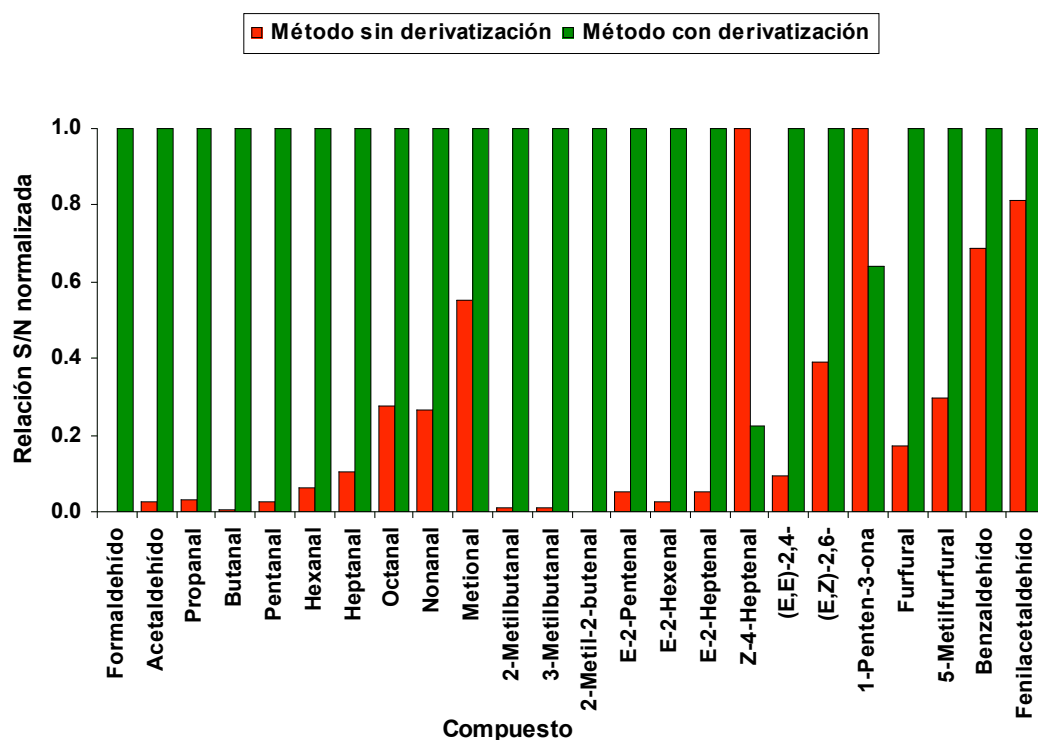


Figura 1.40: Comparativa de las S/N obtenidas utilizando los métodos HS-SPME con y sin derivatización.

Las series homólogas de aldehídos lineales mostraron una tendencia en la eficacia del método de derivatización al compararlo con el método sin derivatización. La eficacia relativa disminuyó al incrementar el tamaño molecular de la serie al igual que con la presencia del grupo tio (-S-) en la cadena lineal (metional). Este decrecimiento en la eficacia del método de derivatización no fue observado en presencia de otros grupos funcionales como los 2-alquenes, los metilalcanales o los dienes. El incremento de efectividad utilizando el método con derivatización para (E,Z)-2,6-nonadienal en comparación con el método de HS-SPME convencional fue menor que en el caso del (E,E)-2,4-heptadienal. Este hecho podría ser debido al menor rendimiento en la reacción con el derivatizante como consecuencia de la mayor longitud

de la cadena y de las interacciones estéricas derivadas de la configuración *cis* en C₆. En lo que respecta a los carbonilos cíclicos, el método con derivatización fue más eficiente para furanos (furfural y 5-metilfurfural) que para los aromáticos (benzaldehído y fenilacetaldéhído).

La trucha, el salmón y la anchoa mostraron las mayores concentraciones de compuestos carbonílicos (Tablas 1.34 y 1.35). La anchoa y el salmón fueron las muestras con los mayores porcentajes de grasa (Tabla 1.33) y además estuvieron sometidas a procesos tecnológicos (anchoado y ahumado) que dan lugar a la formación de los volátiles característicos de los olores y sabores de estos alimentos. Los procesos de anchoado favorecen la formación de volátiles procedentes de la oxidación lipídica o los formados mediante reacciones de Strecker a partir de aminoácidos (Triqui & Reineccius, 1995), ya que la proteólisis y por lo tanto la formación de aminoácidos libres, es una consecuencia de este procesamiento. Ejemplos de aldehídos formados a partir de reacciones de Strecker son el 2-metilbutanal (procedente de la isoleucina), el 3-metilbutanal (procedente de la leucina), el 2-metil-2-butenal (formado a partir de la isoleucina), el metional (de la metionina) o el fenilacetaldéhído (de la fenilalanina) (Triqui & Zouine, 1999). En las muestras de anchoa se detectaron todos los carbonilos detallados en la Tabla 1.34 mediante el método de derivatización en fibra. Este método permitió la determinación del formaldehído, el 2-metil-2-butenal y el 5-metilfurfural que no fueron detectados mediante la técnica HS-SPME convencional. El salmón ahumado mostró altos niveles de compuestos derivados de reacciones de Maillard como el furfural o el 5-metilfurfural (Tabla 1.34), cuya formación se favorece durante los procesos de ahumado, tanto en el músculo de pescado como en la madera quemada utilizada en el tratamiento (Varlet, Prost & Serot, 2007). Los volátiles formados en la madera son transmitidos al músculo como componentes del humo. Los carbonilos procedentes de reacciones de Maillard y Strecker, tales como los metilbutanales, los furfurales, los 2-metil-2-butenaes y el metional no se detectaron en las muestras de trucha mediante el método sin derivatización. Únicamente los metilbutanales en merluza y el metional en jurel fueron detectados con el método sin derivatización. Por tanto, el hecho de que estas muestras no hayan sido sometidas a procesos tecnológicos, que típicamente favorecen la formación de estos volátiles, no quiere decir que estos carbonilos no estén presentes. Debido a sus bajas concentraciones, su detección, mediante HS-SPME, sólo pudo llevarse a cabo mediante el método con derivatización. Las muestras de merluza mostraron los niveles más bajos de volátiles (Tabla 1.34). Los niveles bajos de grasa, sustrato de la oxidación lipídica, y de pigmentos hemo, catalizadores de procesos de autooxidación en el músculo, pueden ser las razones de este resultado. Sin embargo, estas muestras mostraron altos niveles de formaldehído, sólo detectable tras el proceso de

derivatización. La razón de esta observación radica en las altas concentraciones de óxido de trimetilamina (OTMA) y de la enzima óxido de trimetilamina dimetilasa que presenta esta especie y que dan lugar a la formación, mediante catálisis enzimática, de dimetilamina y el propio formaldehído (Hebard, Flick & Martin, 1982).

	<i>Anchoa</i>		<i>Jurel</i>		<i>Merluza</i>		<i>Salmón</i>		<i>Trucha</i>	
	Sin Der.	Der.	Sin Der.	Der.	Sin Der.	Der.	Sin Der.	Der.	Sin Der.	Der.
Acetaldehído	72	12339	80	12832	22	6575	321	13376	66	8621
Propanal	956	40366	729	46325	177	44001	1326	45318	1013	41526
Butanal	39	10731	28	20888	14	12310	42	11590	46	27278
1-Penten-3-ona	816	197	114	125	27	19	50	32	45	37
Pentanal	147	16016	113	21612	33	5543	237	9708	203	23382
E-2-pentenal	370	6990	127	5840	29	905	112	2215	97	3209
Hexanal	332	13689	1014	43544	223	28531	2124	33809	2325	42534
E-2-hexenal	316	6862	58	9075	23	1513	48	1943	47	2816
Heptanal	139	3498	323	12762	49	4019	473	4448	165	6093
Z-4-heptenal	155	35	272	328	237	242	176	39	236	188
E-2-heptenal	29	1044	28	654	28	195	24	461	30	1090
Octanal	171	1839	431	8585	64	2231	542	1980	160	2980
(E,E)-2,4-heptadienal	1243	16476	611	12514	54	1630	261	2746	201	12260
Nonanal	146	2007	394	5841	171	4744	668	2493	263	4093
Formaldehído	-	11449	-	9025	-	15051	-	9463	-	4574
2-Metilbutanal	232	27316	-	1093	11	1733	29	2473	-	942
3-Metilbutanal	376	34527	-	730	20	2845	45	5384	-	622
2-Metil-2-butenal	-	45	-	31	-	-	-	24	-	-
Furfural	10	359	-	290	-	204	128	752	-	137
5-Metilfurfural	-	222	-	197	-	225	84	283	-	105
Metional	562	2398	31	568	-	187	112	202	-	524
Benzaldehído	1581	2376	668	1547	214	891	1739	2533	926	2199
Fenilacetaldehído	1160	1602	23	77	-	73	126	155	-	50
(E,Z)-2,6-nonadienal	260	440	43	340	16	47	33	84	26	185

Tabla 1.34: Relaciones S/N obtenidas tras el análisis de las distintas muestras de músculo de pescado con los HS-SPME métodos con y sin derivatización de los analitos.

	<i>Anchoa</i>	<i>Jurel</i>	<i>Merluza</i>	<i>Salmón</i>	<i>Trucha</i>
Acetaldehído	417,5 ± 78,7	238,0 ± 12,2	147,8 ± 25,4	576,5 ± 25,7	407,6 ± 21,8
Propanal	730,7 ± 160,2	711,4 ± 53,3	572,7 ± 28,1	763,5 ± 51,7	889,1 ± 100,7
Butanal	12,5 ± 7,9	28,8 ± 3,5	22,4 ± 5,0	18,0 ± 6,4	62,3 ± 2,3
1-Penten-3-ona	36,4 ± 15,8	12,7 ± 1,7	< LOQ	5,6 ± 3,3	4,0 ± 1,2
Pentanal	32,3 ± 6,0	32,1 ± 4,5	11,3 ± 1,6	25,4 ± 7,0	50,6 ± 1,4
E-2-pentenal	43,2 ± 20,4	31,3 ± 1,7	4,4 ± 1,1	25,2 ± 11,1	39,1 ± 2,5
Hexanal	27,3 ± 4,4	95,1 ± 3,5	62,8 ± 6,7	88,9 ± 10,9	149,3 ± 14,0
E-2-hexenal	25,3 ± 5,0	18,7 ± 2,2	4,4 ± 0,7	7,4 ± 1,7	15,5 ± 0,7
Heptanal	4,8 ± 3,0	20,8 ± 1,1	7,3 ± 1,1	16,3 ± 5,7	16,7 ± 1,2
Z-4-heptenal	3,8 ± 0,3	16,3 ± 2,2	17,2 ± 1,4	5,9 ± 1,6	15,2 ± 3,8
E-2-heptenal	1,7 ± 1,0	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0	1,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3
Octanal	0,8 ± 1,2	10,0 ± 2,0	1,9 ± 0,3	4,5 ± 2,5	5,8 ± 1,1
(E,E)-2,4-heptadienal	44,5 ± 29,5	41,7 ± 5,1	5,6 ± 1,1	18,7 ± 6,0	44,7 ± 2,7
Nonanal	< LOQ	3,3 ± 2,0	1,4 ± 0,3	0,4 ± 1,6	5,0 ± 1,8

Tabla 1.35: Concentraciones obtenidas en el análisis de carbonilos volátiles mediante HS-SPME con derivatización en fibra.

1.4.4. Conclusiones

La determinación de compuestos carbonílicos en músculo de pescado, mediante la derivatización con PFBHA sobre la superficie de una fibra de SPME, proporcionó un incremento notable en la sensibilidad y selectividad con respecto a la técnica HS-SPME convencional. La comparación de ambas metodologías en muestras de músculo de diferentes especies de pescado sometidas a diferentes procesos tecnológicos mostró como la derivatización sobre la superficie de la fibra permitió la determinación de varios carbonilos no detectados mediante la metodología de HS-SPME sin derivatización. Entre las ventajas de la técnica HS-SPME convencional destaca la posibilidad de la determinación de otras familias de compuestos como alcoholes, ésteres, furanos o dionas, entre los que se encuentran importantes contribuyentes de los aromas típicos de músculo de pescado o marcadores de procesos de oxidación lipídica. Por lo tanto, la elección de una y otra metodología para la determinación de volátiles dependerá de los objetivos del análisis.

1.5. CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se ha descrito el trabajo llevado a cabo para desarrollar métodos de análisis de sustancias que se destruyen (ascorbato) o se forman (volátiles) durante el transcurso de la oxidación lipídica en matrices de alimentos derivados del pescado o con presencia de lípidos de pescado. A continuación se presentan las principales conclusiones del trabajo realizado.

Se desarrolló un método sencillo y sensible para la determinación de ácido ascórbico y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico, en muestras de músculo de pescado. El método se basó en la oxidación del AA a DHAA y su posterior derivatización con DMPD para dar lugar a la formación de un compuesto fluorescente. Tras la extracción y concentración del derivado mediante extracción líquido-líquido se efectuó la determinación analítica mediante HPLC acoplada a un detector de fluorescencia. La utilización de DMPD como agente derivatizante proporcionó mejores resultados en términos de sensibilidad que la OPDA y el rendimiento de la reacción de derivatización estuvo muy influenciado por el pH. La aplicación a la detección del AA y DHAA en varias especies de pescado mostró la existencia de una relación inversa entre la susceptibilidad del músculo a la oxidación y la relación de concentraciones AA/DHAA contenidos en el mismo.

Debido a la importancia que en los últimos años están adquiriendo los alimentos enriquecidos en aceite de pescado y la susceptibilidad de los mismos a la oxidación, se hace necesario el diseño de métodos de seguimiento del deterioro lipídico en este tipo de matrices. Por esta razón, se desarrolló un método de análisis de los volátiles responsables de los olores y sabores asociados a la rancidez, en emulsiones enriquecidas en aceite de pescado. La HS-SPME y la posterior detección mediante GC-MS fueron las técnicas elegidas para llevar a cabo el análisis debido a las ventajas que presentan con respecto a otras metodologías. El estudio de optimización demostró la influencia en el rendimiento de la extracción de factores como tipo de fibra, tiempo y temperatura de incubación, agitación y volumen de muestra. El método mostró varias ventajas con respecto a DHS, la técnica más utilizada en el análisis de este tipo de muestras, entre las que destacaron su rapidez, su menor coste por análisis y la necesidad de una menor cantidad de muestra. La metodología desarrollada se empleó en la determinación de los analitos en muestras de leche y mayonesa enriquecidas en aceite de pescado, con el objetivo de encontrar marcadores

del proceso de oxidación lipídica. Los resultados mostraron altas correlaciones con la detección sensorial de la rancidez y con índices clásicos de detección de la oxidación como PV y TBARS. Los mejores marcadores fueron el (E,E)-2,4-heptadienal, el hexanal, el E-2-hexenal, el E-2-heptenal y el butanal en las muestras de leche, mientras que el 1-penten-3-ol, el 2-etilfurano, el E-2-penten-3-ol y el propanal fueron seleccionados en las muestras de mayonesa.

Del mismo modo, se optimizó un método para la determinación de volátiles formados a partir de la oxidación lipídica en músculo de pescado mediante HS-SPME y GC-MS. La metodología desarrollada permitió la detección de una gran variedad de compuestos químicos de distintas familias, descritos en la bibliografía como responsables de los olores y sabores asociados a la rancidez. Se estudió la influencia en la eficacia de la extracción de factores como tipo de fibra, tiempo y temperatura de incubación, efecto salino, cantidad de muestra y agitación del extracto. El método resultó barato, selectivo y automatizable y la detección de los analitos en modo SIM proporcionó una gran sensibilidad que permitió la utilización de un tamaño de muestra muy reducido (solamente 3 g de músculo). La aplicación al análisis de músculo de jurel, picado y almacenado a 4 °C, permitió seleccionar varios marcadores para monitorizar el proceso de oxidación lipídica. El 1-penten-3-ol, la 2,3-pentanediona y el 1-octen-3-ol fueron seleccionados, ya que fueron los que más se correlacionaron con el análisis sensorial y con los distintos índices de seguimiento del deterioro lipídico.

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad y la selectividad de la determinación de carbonilos volátiles en muestras de músculo de pescado, se desarrolló un método basado en la extracción/derivatización de los analitos sobre la superficie de una fibra de SPME utilizando la PFBHA como agente derivatizante. Se estudió la influencia de distintos parámetros que afectaron a la eficacia de los procesos simultáneos de extracción y reacción entre el derivatizante y los analitos. El incremento de sensibilidad gracias al proceso de derivatización combinado con la detección de las oximas formadas en modo SIM permitió alcanzar LOQs del orden de ppt. El método fue aplicado a la determinación de volátiles carbonílicos en muestras de músculo de distintas especies de pescado sometidas a varios tratamientos tecnológicos. Se encontraron grandes diferencias en la composición volátil entre especies y sobre todo entre los distintos procesos tecnológicos a los que fueron sometidas. La comparación con el método de detección de volátiles sin derivatización arrojó grandes diferencias en cuanto a sensibilidad y selectividad hasta el punto de que algunos de los analitos sólo pudieron ser detectados tras su derivatización,

debido a las bajas concentraciones contenidas en el músculo. El método HS-SPME sin derivatización permitió la detección de compuestos no carbonílicos (alcoholes, ésteres, furanos,...) que contribuyen de manera importante a los aromas de las distintas especies de pescado o los que se forman tras la aplicación de los diferentes tratamientos tecnológicos.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

Alasalvar, C., Taylor, K. D., & Shahidi, F. (2005). Comparison of volatiles of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) during storage in ice by dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 53(7), 2616-2622.

AOCS (1989). *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society*. D. Firestone. AOCS. Champaign, IL.

Aro, T., Tahvonen, R., Koskinen, L., & Kallio, H. (2003). Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling-gas chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.*, 216(6), 483-488.

Beltrán, G., Aguilera, M. P., & Gordon, M. H. (2005). Solid phase microextraction of volatile oxidation compounds in oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, 92(3), 401-406.

Bianchi, F., Careri, M., Musci, M., & Mangia, A. (2007). Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC-MS analysis. *Food Chem.*, 100(3), 1049-1053.

Bianchi, F., Careri, M., Corradini, C., Musci, M., & Mangia, A. (2005). Innovative Method for Ultratrace Determination of Formaldehyde in Frozen Fish: SPME Extraction and GC-ITMS/MS Analysis. *Curr. Anal. Chem.*, 1(2), 129-134.

Bilic, N. (1991). Assay for both ascorbic and dehydroascorbic acid in dairy foods by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization with methoxy- and ethoxy-1,2-phenylenediamine. *J. Chromatogr.*, 543(2), 367-374.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*, 37(8), 911-917.

Bognár, A., & Daood, H. G. (2000). Simple in-line postcolumn oxidation and derivatization for the simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acids in foods. *J. Chromatogr. Sci.*, 38(4), 162-168.

Brannan, R. G., & Erickson, M. C. (1996). Quantification of antioxidants in channel catfish during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.*, 44(6), 1361-1366.

Brunton, N. P., Cronin, D. A., Monahan, F. J., & Durcan, R. (2000). A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem.*, 68(3), 339-345.

Cancho, B., Ventura, F., & Galceran, M. T. (2002). Determination of aldehydes in drinking water using pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 943(1), 1-13.

Carr, R. S., Bally, M. B., Thomas, P., & Neff, J. M. (1983). Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Anal. Chem.*, 55(8), 1229-1232.

Cavalli, J. F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A. M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chem.*, 88(1), 151-157.

- Chapman, R. A., & Mackay, K. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *JAOCSJ. Am. Oil Chem. Soc.*, 26, 360-363.
- Dabrowski, K., & Hinterleitner, S. (1989). Applications of a simultaneous assay of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulphate in biological materials. *Analyst*, 114(1), 83-87.
- Deng, C., Li, N., Zhu, W., Qian, J., Yang, X., & Zhang, X. (2005). Rapid determination of C6-aldehydes in tomato plant emission by gas chromatography - Mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *J. Sep. Sci.*, 28(2), 172-176.
- DOCE (1989). *Baremo de clasificación de frescura*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L5/21.
- Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J., & Malle, P. (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 86(4), 600-611.
- Duflos, G., Moine, F., Coin, V. M., & Malle, P. (2005). Determination of volatile compounds in whiting (*Merlangius merlangus*) using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, 43(6), 304-312.
- Edirisinghe, R. K. B., Graffham, A. J., & Taylor, S. J. (2007). Characterisation of the volatiles of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) during storage by solid phase microextraction and GC-MS and their relationship to fish quality parameters. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 42(10), 1139-1147.
- Esteve, M.J., Farré, R., & Frígola, A. (1995). Determination of ascorbic acid in asparagus by differential pulse polarography. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351(8), 804-805.
- Fabre, M., Aubry, V., & Guichard, E. (2002). Comparison of different methods: Static and dynamic headspace and solid-phase microextraction for the measurement of interactions between milk proteins and flavor compounds with an application to emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 50(6), 1497-1501.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid Oxidation*. West Ferry, Dundee, Scotland: The Oily Press LTD.
- Frankel, E. N., Hu, M., & Tappel, A. L. (1989). Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids*, 24(11), 976-981.
- Garrido, J. L., & Medina, I. (2002). Identification of minor fatty acids in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by GC-MS of their 2-alkenyl-4,4-dimethyloxazoline derivatives. *Anal. Chim. Acta*, 465(1-2), 409-416.
- Gioti, E. M., Fiamegos, Y. C., Skalkos, D. C., & Stalikas, C. D. (2007). Improved method for the in vitro assessment of antioxidant activity of plant extracts by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1152(1-2), 150-155.
- Girard, B., & Nakai, S. (1994). Grade Classification of Canned Pink Salmon with Static Headspace Volatile Patterns. *J. Food Sci.*, 59(3), 507-512.
- Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N., & Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 881(1-2), 309-316.
- Górecki, T., & Pawliszyn, J. (1997). Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction: Part 1. Theoretical considerations. *Analyst*, 122(10), 1079-1086.

Guillén, M. D., & Errecalde, M. C. (2002). Volatile components of raw and smoked black bream (*Brama raii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) studied by means of solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 82(9), 945-952.

Hallier, A., Serot, T., & Prost, C. (2004). Odour of cooked silurus (*Silurus glanis*) flesh: Evaluation by sensory analysis and comparison of collection methods to assess the odour representativeness of extracts obtained by dynamic headspace. *J. Sci. Food Agric.*, 84(15), 2113-2122.

Hartvigsen, K., Lund, P., Hansen, L. F., & Holmer, G. (2000). Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonnaise during storage. *J. Agric. Food Chem.*, 48(10), 4858-4867.

Hebard, C. E., Flick, G. J., & Martin, R. E. (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In R. E. Martin *Chemistry and biochemistry of marine food products* (pp. 149-304). Westport, CT: AVI Publishing.

Herbes, S. E., & Allen, C. P. (1983). Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40(8), 1315-1317.

Hsieh, Y., & Regenstein, J. M. (1991). Factors Affecting Quality of Fish Oil Mayonnaise. *J. Food Sci.*, 56(5), 1298-1301.

Huang, S., Frankel, E. N., & German, J. B. (1994). Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 42(10), 2108-2114.

Iwase, H., & Ono, I. (1993). Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in juices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using L-cysteine as precolumn reductant. *J. Chromatogr.*, 654(2), 215-220.

Iwata, T., Yamaguchi, M., & Hara, S. (1985). Determination of total ascorbic acid in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 344, 351-355.

Jacobsen, C., Timm, M., & Meyer, A. (2001). Oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Ascorbic acid and low pH increase oxidative deterioration. *J. Agric. Food Chem.*, 49(8), 3947-3956.

Jafar, S. S., Hultin, H. O., Bimbo, A. P., Crowther, J. B., & Barlow, S. M. (1994). Stabilization by antioxidants of mayonnaise made from fish oil. *J. Food Lipids*, 1(4), 295-311.

Jónsdóttir, R., Bragadóttir, M., & Arnarson, G. Ö. (2005). Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *J. Food Sci.*, 70(7) C433-C440.

Josephson D. B., & Lindsay R. C. (1987). Retro-aldol degradations of unsaturated aldehydes: Role in the formation of c4-heptenal from t2,c6-nonadienal in fish, oyster and other flavors. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(1), 132-138.

Kacem, B., Marshall, M. R., Matthews, R. F., & Gregory, J. F. (1986). Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and UV absorbance. *J. Agric. Food Chem.*, 34(2), 271-274.

Kanavouras, A., Kiritsakis, A., & Hernandez, R. J. (2005). Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chem.*, 90(1-2), 69-79.

Kawai, T. (1996). Fish Flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36(3), 257-298.

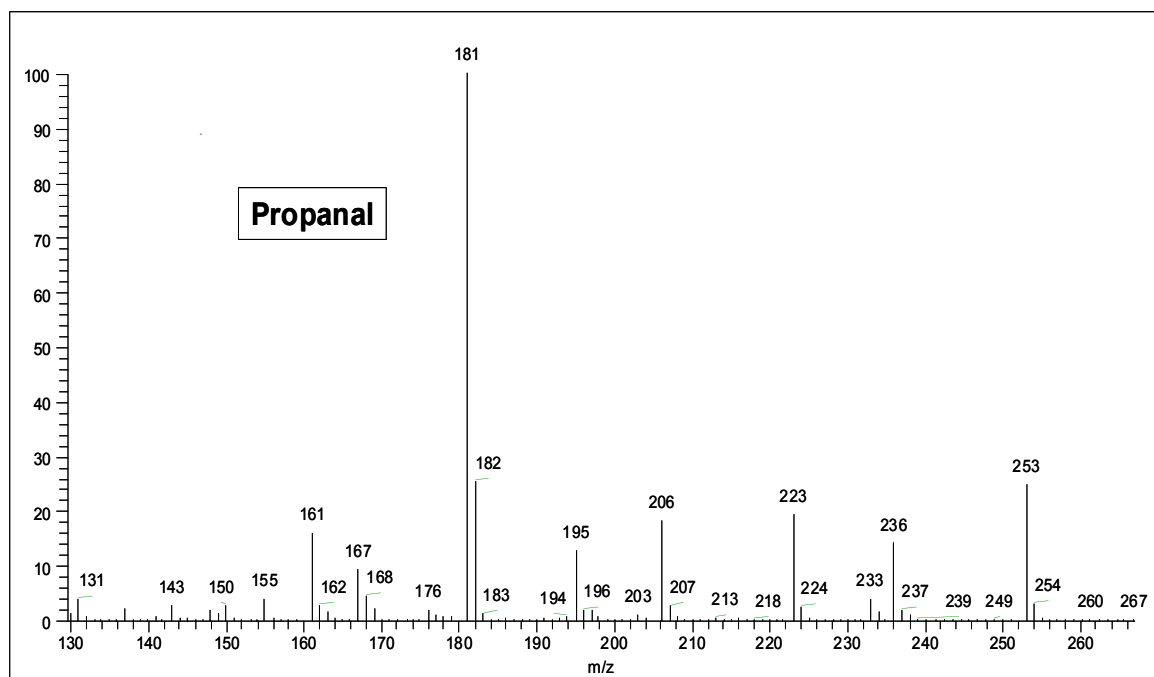
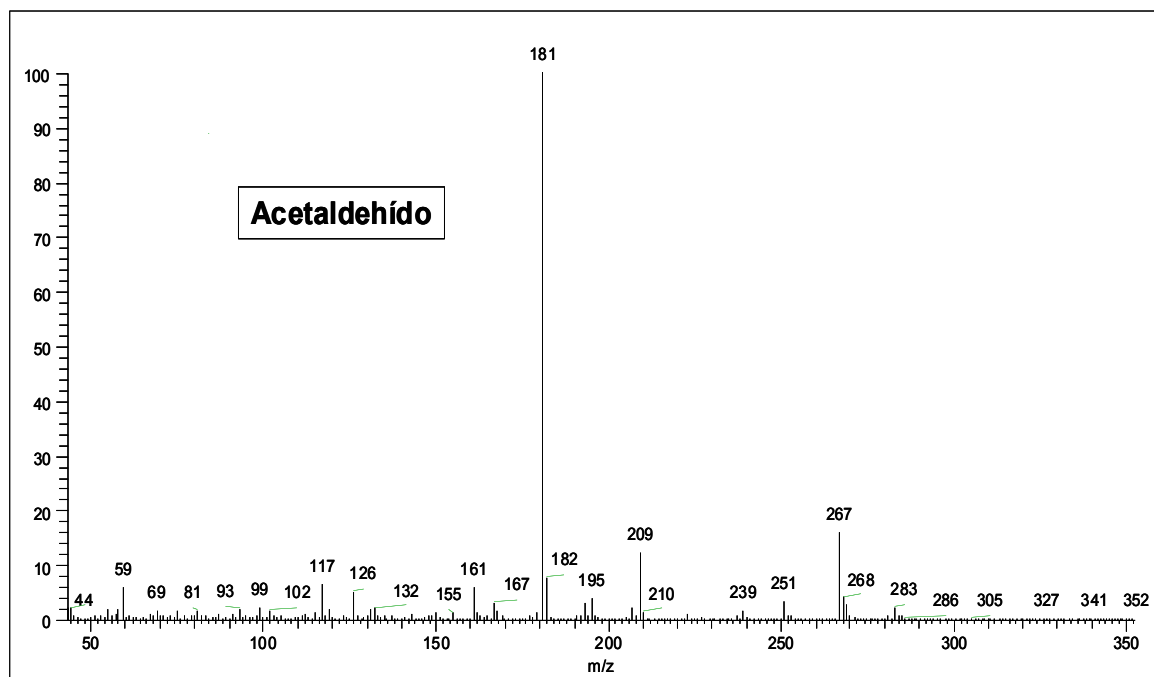
- King, M. F., Hamilton, L., Mathews, M. A., Rule, D. C., & Field, R. A. (1993). Isolation and identification of volatiles and condensable material in raw beef with supercritical carbon-dioxide extraction. *J. Agric. Food Chem.*, 41(11), 1974-1981.
- Kmetec, V. (1992). Simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic, ascorbic and dehydroascorbic acid by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10(10-12), 1073-1076.
- Krishnamoorthy, R. V., & Narasimhan, T. (1972). Ascorbic acid and fat content in the red and white muscles of carp, *Catla catla*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 43(4), 991-997.
- Kulås, E., Olsen, E., & Ackman, R. G. (2002). Effect of α -, γ -, and δ -tocopherol on the distribution of volatile secondary oxidation products in fish oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104(8), 520-529.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27(1), 114-120.
- Let, M. B., Jacobsen, C., Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2003). Oxidative flavour deterioration of fish oil enriched milk. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105(9), 518-528.
- Let, M. B., Jacobsen, C., & Meyer, A. S. (2004). Effects of fish oil type, lipid antioxidants and presence of rapeseed oil on oxidative flavour stability of fish oil enriched milk. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106(3), 170-182.
- Li, X., Zeng, Z., Zhou, J., Gong, S., Wang, W., & Chen, Y. (2004). Novel fiber coated with amide bridged-calix[4]arene used for solid-phase microextraction of aliphatic amines. *J. Chromatogr. A*, 1041(1-2), 1-9.
- Lykkesfeldt, J., Loft, S., & Poulsen, H. E. (1995). Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high- performance liquid chromatography with coulometric detection - Are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Anal. Biochem.*, 229(2), 329-335.
- Martos, P. A., & Pawliszyn, J. (1998a). Sampling Carbonyl Compounds with Solid Phase Microextraction Utilizing On-Fiber Derivatization. *ACS Symposium Series*, Washington: American Chemical Society 705, 92-106.
- Martos, P. A., & Pawliszyn, J. (1998b). Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Anal. Chem.*, 70(11), 2311-2320.
- Medina, I., Saeed, S., & Howell, N. (1999). Enzymatic oxidative activity in sardine (*Sardina pilchardus*) and herring (*Clupea harengus*) during chilling and correlation with quality. *Eur. Food Res. Technol.*, 210(1), 34-38.
- Medina, I., Satué-Gracia, M. T., & Frankel, E. N. (1999). Static Headspace Gas Chromatographic Analyses to Determine Oxidation of Fish Muscle Lipids during Thermal Processing. *JAOCsJ. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(2), 231-236.
- Mirhosseini, H., Salmah, Y., Nazimah, S. A. H., & Tan, C. P. (2007). Solid-phase microextraction for headspace analysis of key volatile compounds in orange beverage emulsion. *Food Chem.*, 105(4), 1659-1670.
- Mori, K., Kidawara, M., Iseki, M., Umegaki, C., & Kishi, T. (1998). A simple fluorometric determination of vitamin C. *Chem. Pharm. Bull.*, 46(9), 1474-1476.
- Nielsen, H. (1992). n-3 Polyunsaturated fish fatty-acids in a fish-oil-supplemented bread. *J. Sci. Food Agric.*, 59(4), 559-562.

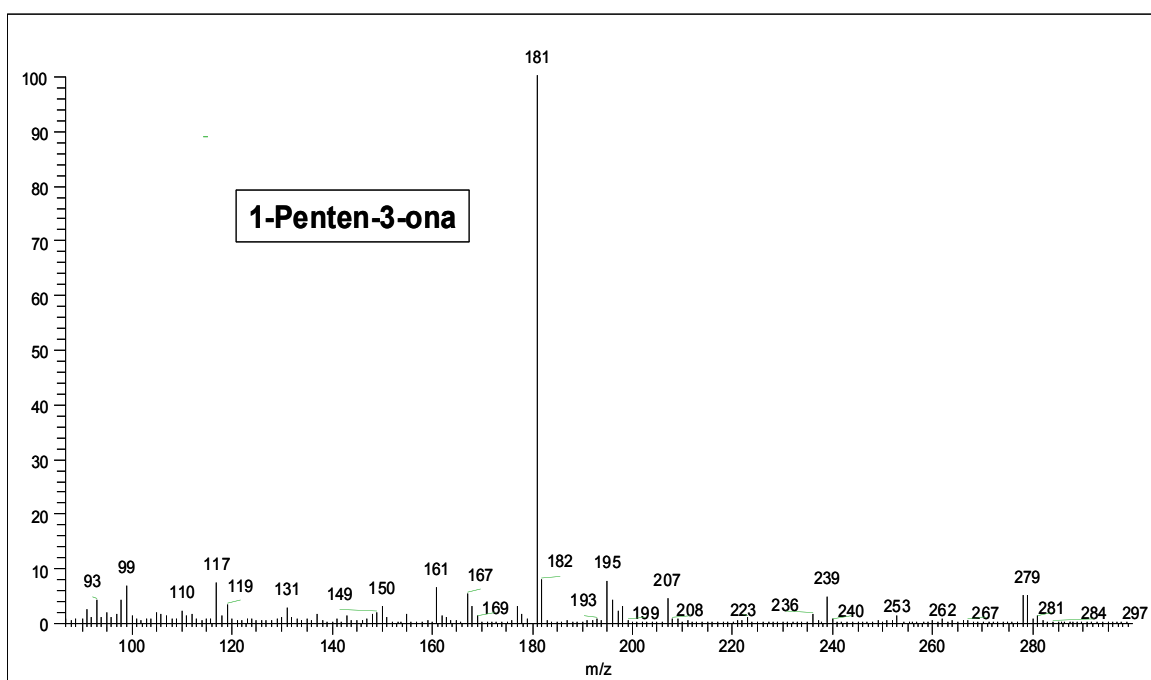
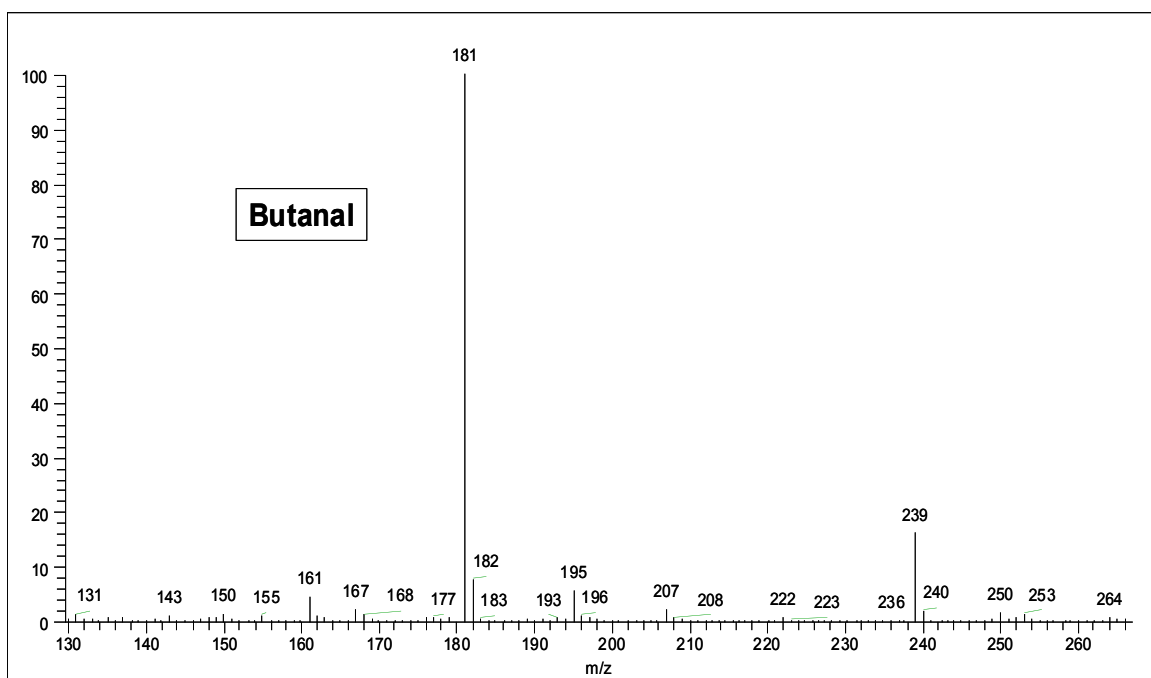
- Okeyo, P., Rentz, S. M., & Snow, N. H. (1997). Analysis of Steroids from Human Serum by SPME with Headspace Derivatization and GC/MS. *JHRC J.High Resol.Chromatogr.*, 20(3), 171-173.
- Ólafsdóttir, G., Jonsdóttir, R., Lauzon, H. L., Luten, J., & Kristbergsson, K. (2005). Characterization of volatile compounds in chilled cod (*Gadus morhua*) fillets by gas chromatography and detection of quality indicators by an electronic nose. *J.Agric.Food Chem.*, 53(26), 10140-10147.
- Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.*, 92(3), 547-557.
- Prost, C., Serot, T., & Demaimay, M. (1998). Identification of the Most Potent Odorants in Wild and Farmed Cooked Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J.Agric.Food Chem.*, 46(8), 3214-3219.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., López-Hernández, J., & Simal-Lozano, J. (2001). Determination of vitamin C in sea urchin: Comparison of two HPLC methods. *Chromatographia*, 53 (SPEC. ISS) S246-S249.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1190(1-2), 342-349.
- Sanches-Silva, A., Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., López-Hernández, J., & Paseiro-Losada, P. (2004). Determination of hexanal as indicator of the lipidic oxidation state in potato crisps using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1046(1-2), 75-81.
- Schnepf, M., Spencer, G., & Carlat, J. (1991). Chemical and sensory characteristics of stored menhaden oil/soybean oil blends. *JAOC SJ. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(5), 281-284.
- Sérot, T., Regost, C., Prost, C., Robin, J., & Arzel, J. (2001). Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*). *J. Sci. Food Agric.*, 81(14), 1339-1346.
- Shahidi, F. (1998). *Flavor of meat, meat products and seafood*. London, UK: Blackie Academic & Professional, Thomson Science.
- Skoog, D. A., Holler, J., & Nieman, T. (2000). *Principios de análisis instrumental*. Madrid: McGraw-Hill.
- Sokal, R., & Rohlf, F. (1981). *Biometry*. San Francisco, CA: Freeman and Company.
- Song, J., Fan, L., & Beaudry, R. M. (1998). Application of Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry for Rapid Analysis of Flavor Volatiles in Tomato and Strawberry Fruits. *J.Agric.Food Chem.*, 46(9), 3721-3726.
- Speek, A. J., Schrijver, J., & Schreurs, W. H. P. (1984). Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J.Agric.Food Chem.*, 32(2), 352-355.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J.Biochem.Biophys.Methods*, 70(2), 235-242.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2004). Derivatization and solid-phase microextraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23(8), 553-561.

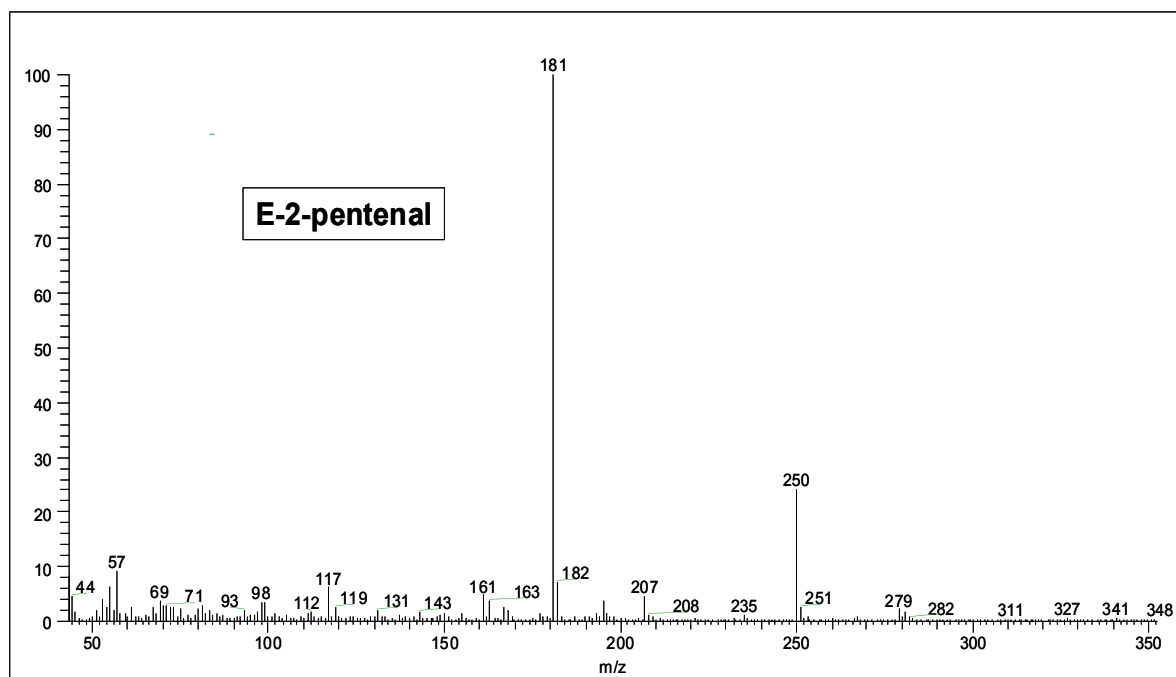
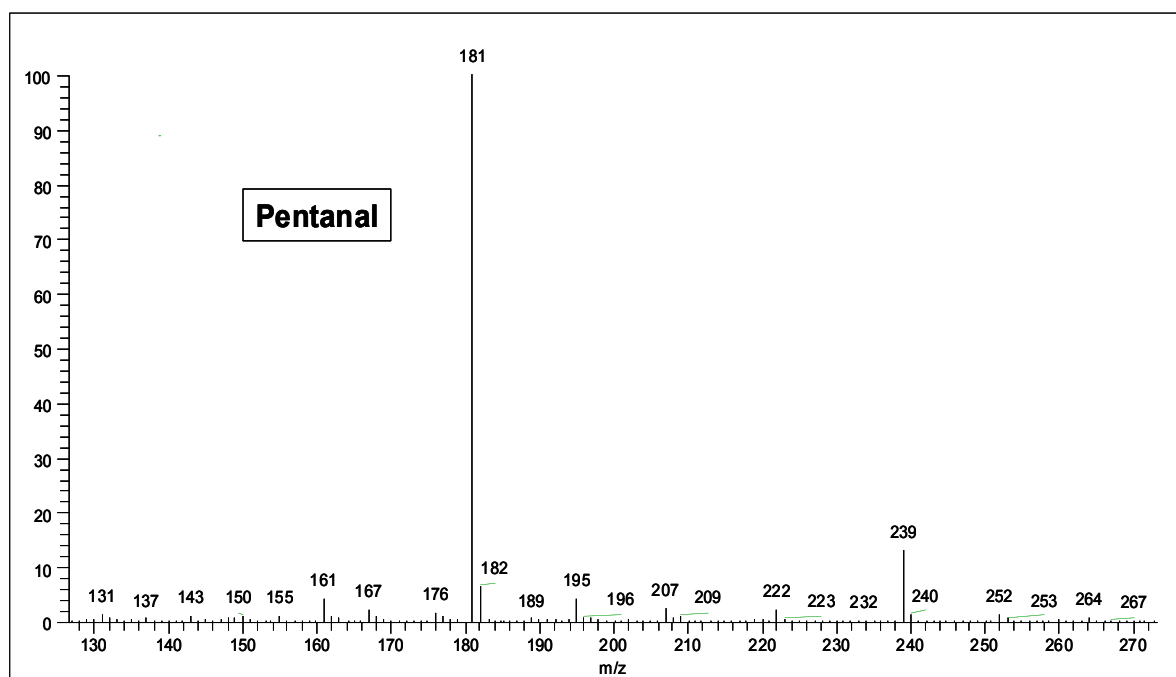
- Triqui, R., & Zouine, K. (1999). Sensory and instrumental assessments of the ripening process of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *LWT - Food Sci. Technol.*, 32(4), 203-207.
- Triqui, R., & Reineccius, G. A. (1995). Changes in flavor profiles with ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *J. Agric. Food Chem.*, 43(7), 1883-1889.
- Valls, F., Sancho, M. T., Fernández -Muñoz, M. A., Alonso -Torre, S., & Checa, M. A. (2002). High-pressure liquid chromatographic determination of ascorbic acid in cooked sausages. *J. Food Prot.*, 65(11), 1771-1774.
- Vanderslice, J. T., & Higgs, D. J. (1984). HPLC analysis with fluorometric detection of vitamin C in food samples. *J. Chromatogr. Sci.*, 22(11), 485-489.
- Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C., & Serot, T. (2006). Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. *J. Agric. Food Chem.*, 54(9), 3391-3401.
- Varlet, V., Prost, C., & Serot, T. (2007). Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chem.*, 105(4), 1536-1556.
- Venkateshwarlu, G., Let, M. B., Meyer, A. S., & Jacobsen, C. (2004). Chemical and Olfactometric Characterization of Volatile Flavor Compounds in a Fish Oil Enriched Milk Emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 52(2), 311-317.
- Vichi, S., Castellote, A. I., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *J. Chromatogr. A*, 983, 19-33.
- Vyncke, M. (1970). Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette Wiss Technol*, 72(12), 1084-1087.
- Waagbø, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E., & Sandnes, K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem*, 12(1), 61-73.
- Wang, Q., O'Reilly, J., & Pawliszyn, J. (2005). Determination of low-molecular mass aldehydes by automated headspace solid-phase microextraction with in-fibre derivatisation. *J. Chromatogr. A*, 1071(1-2), 147-154.
- Wierda, R. L., Fletcher, G., Xu, L., & Dufour, J. -. (2006). Analysis of Volatile Compounds as Spoilage Indicators in Fresh King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) During Storage Using SPME-GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 54(22), 8480-8490.
- Yang, X., & Peppard, T. (1994). Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 42(9), 1925-1930.
- Zapata, S., & Dufour, J. (1992). Ascorbic, Dehydroascorbic and Isoascorbic Acid Simultaneous Determinations by Reverse Phase Ion Interaction HPLC. *J. Food Sci.*, 57(2), 506-511.

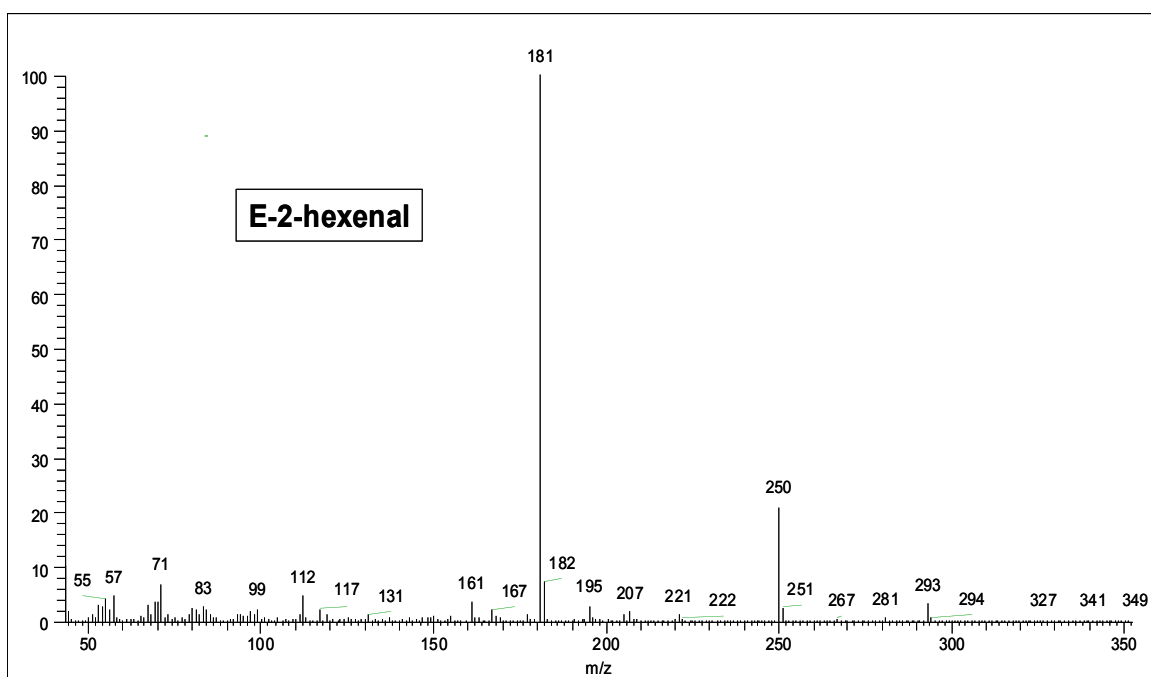
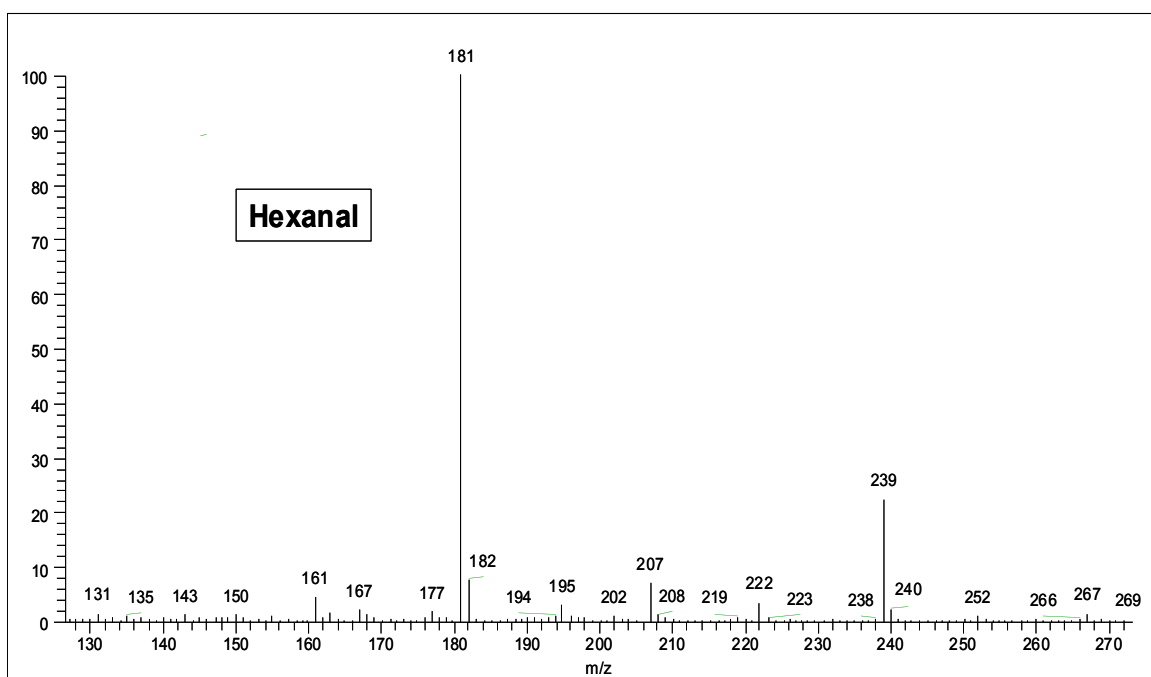
1.7. ANEXO I.

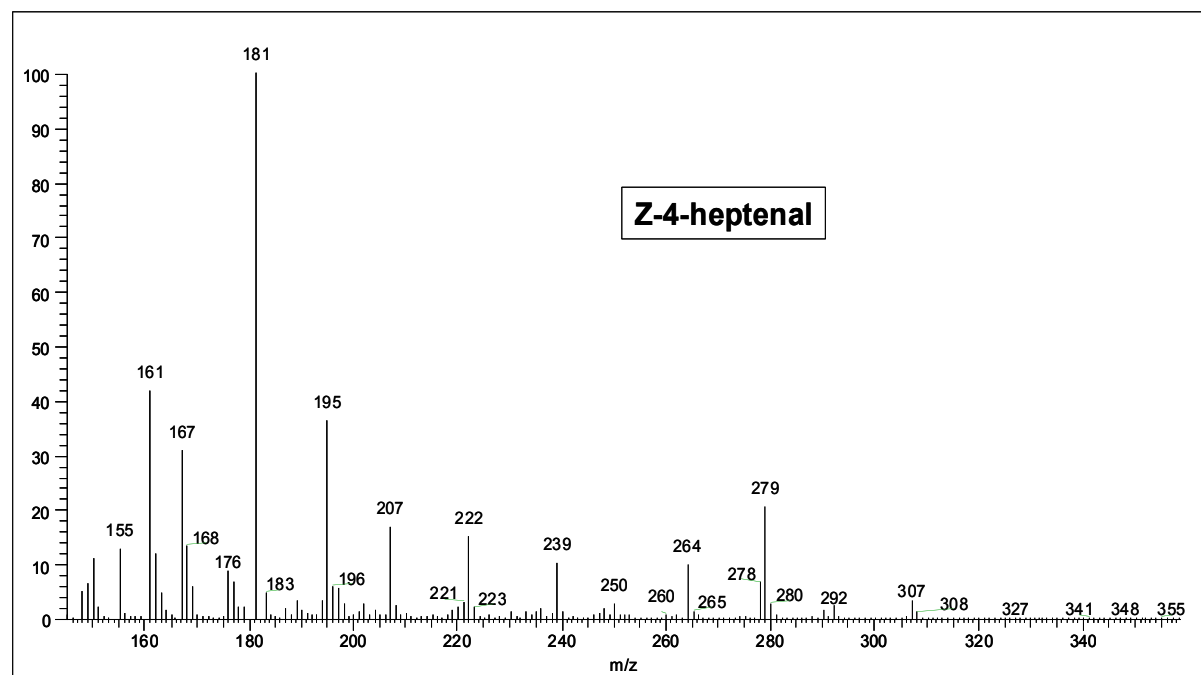
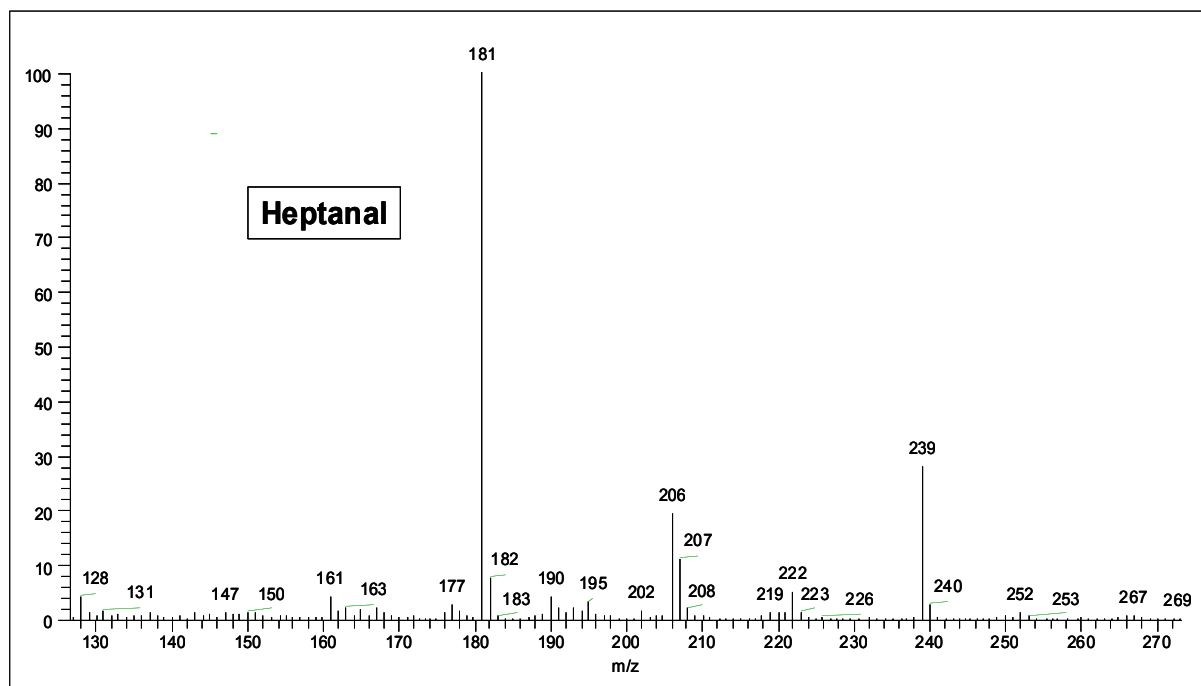
Espectros de masas de las oximas formadas tras la derivatización de los distintos carbonilos.

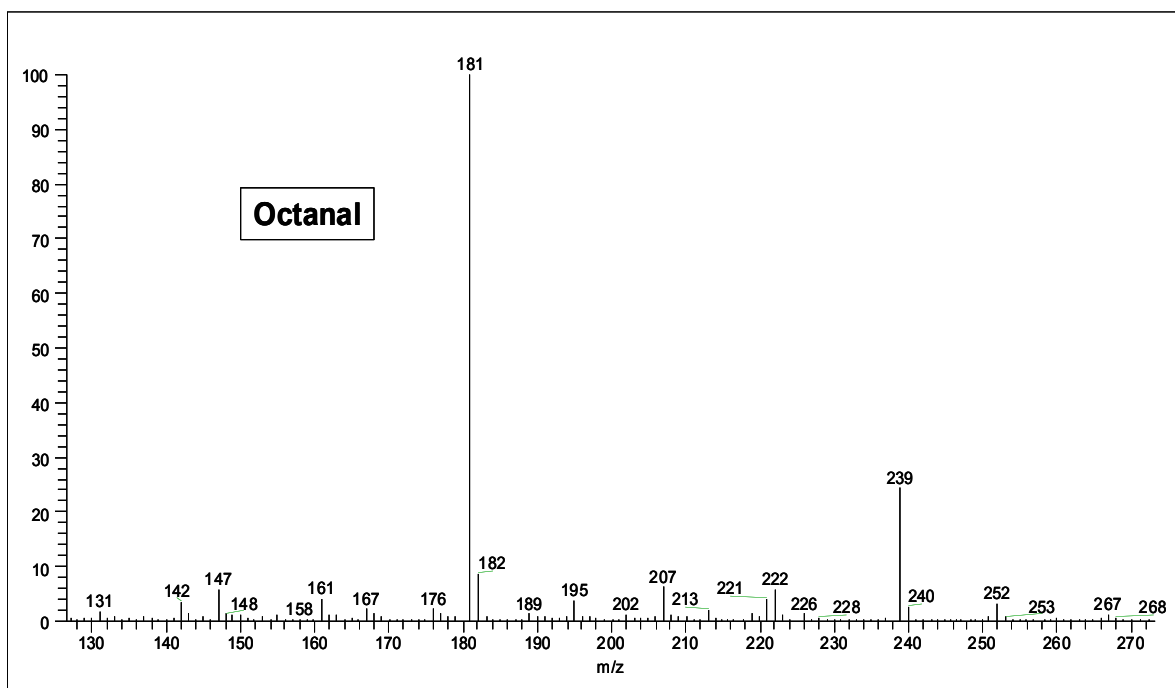
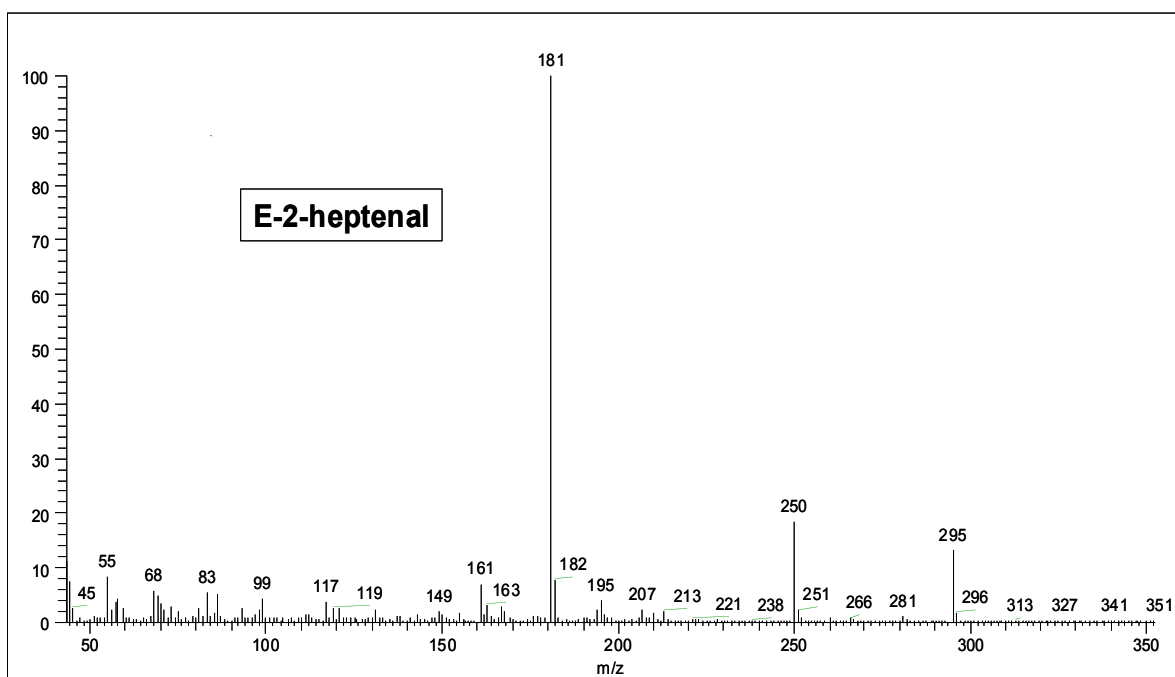


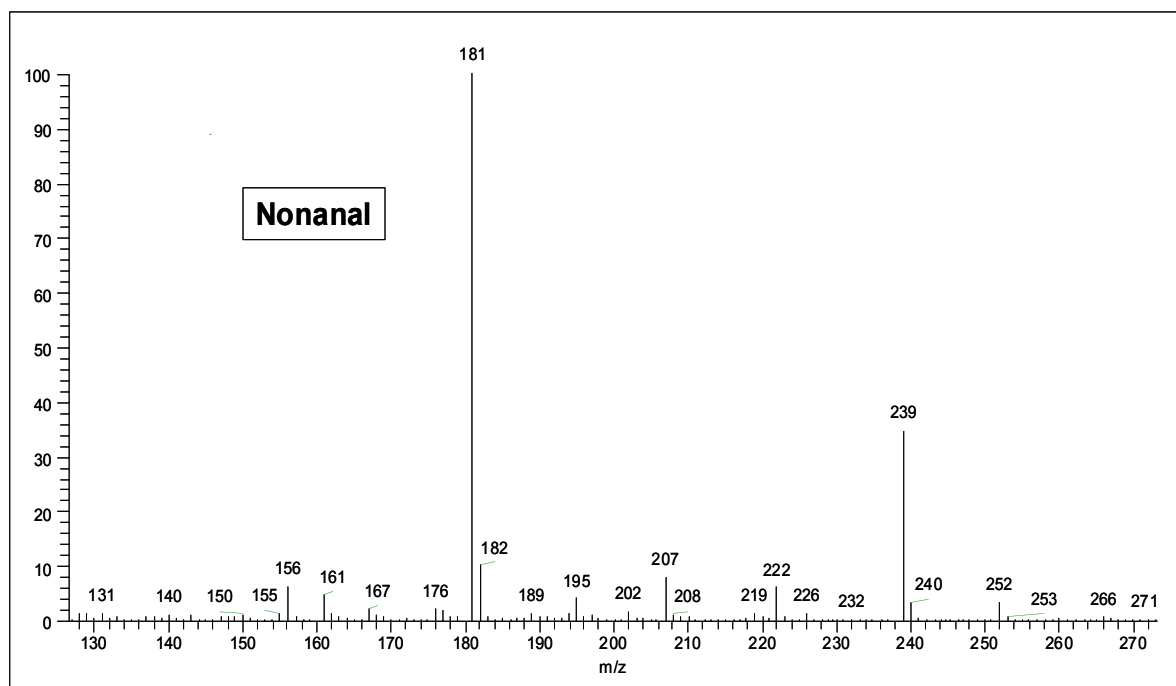
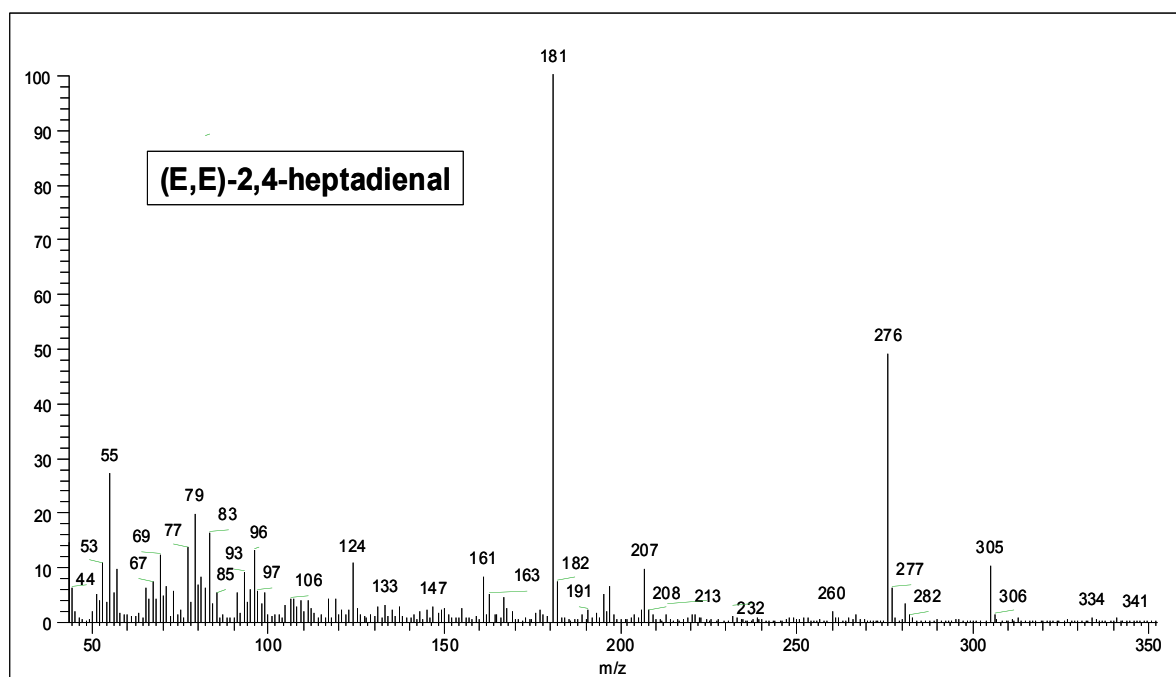


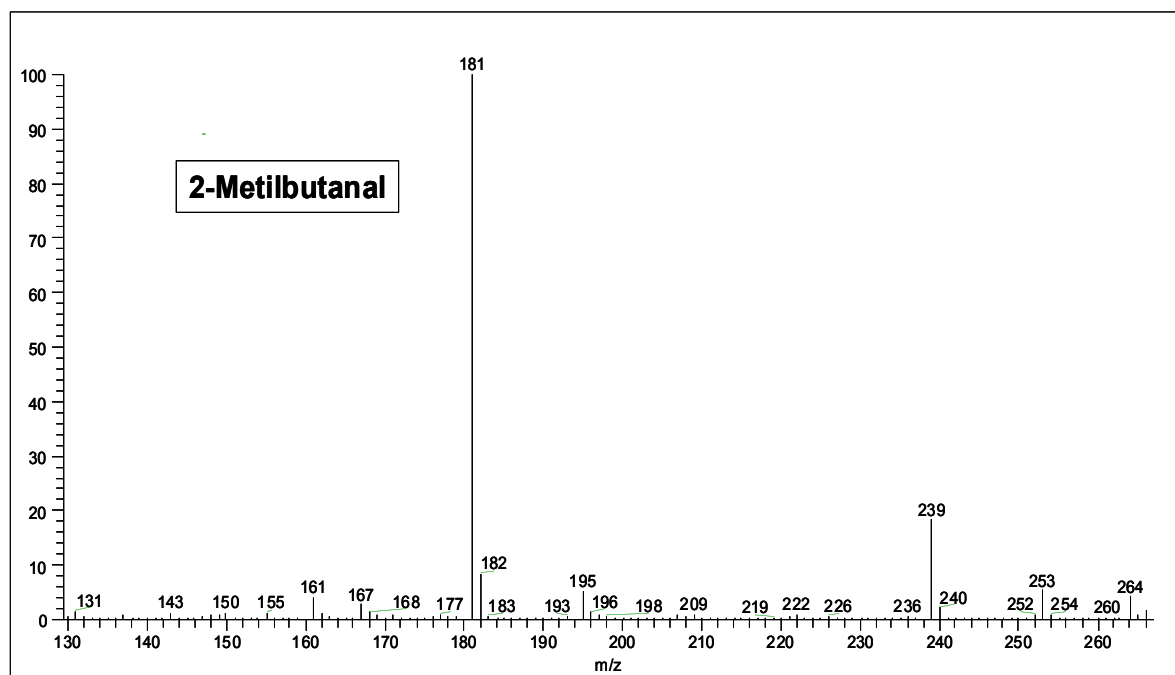
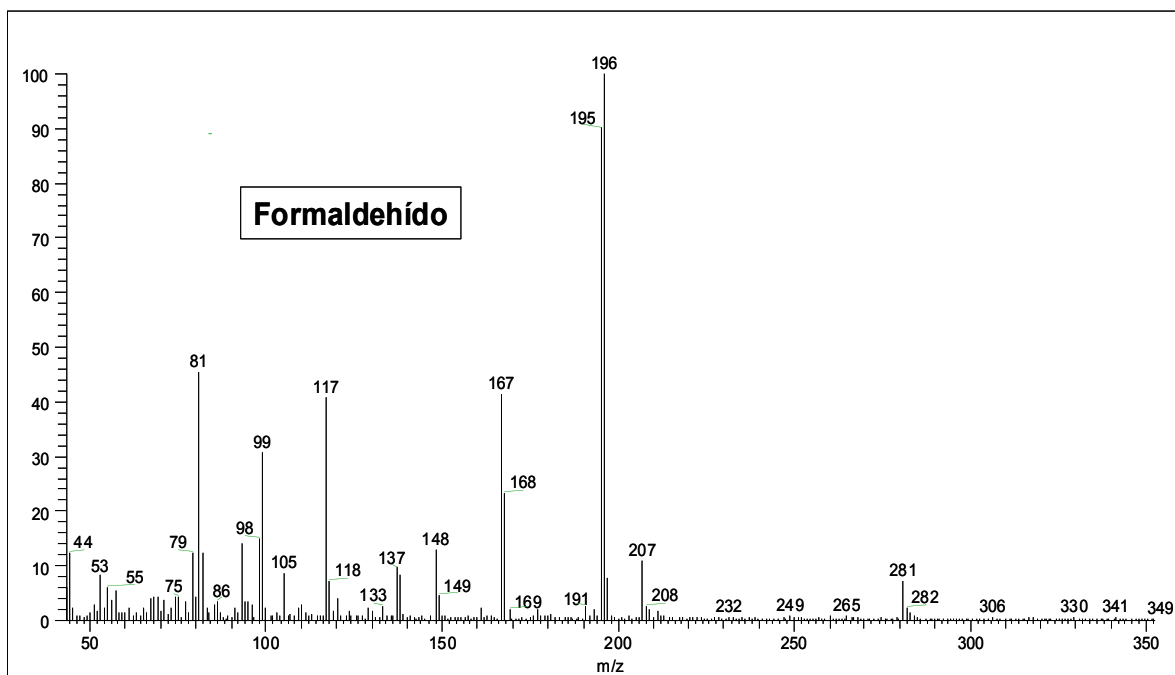


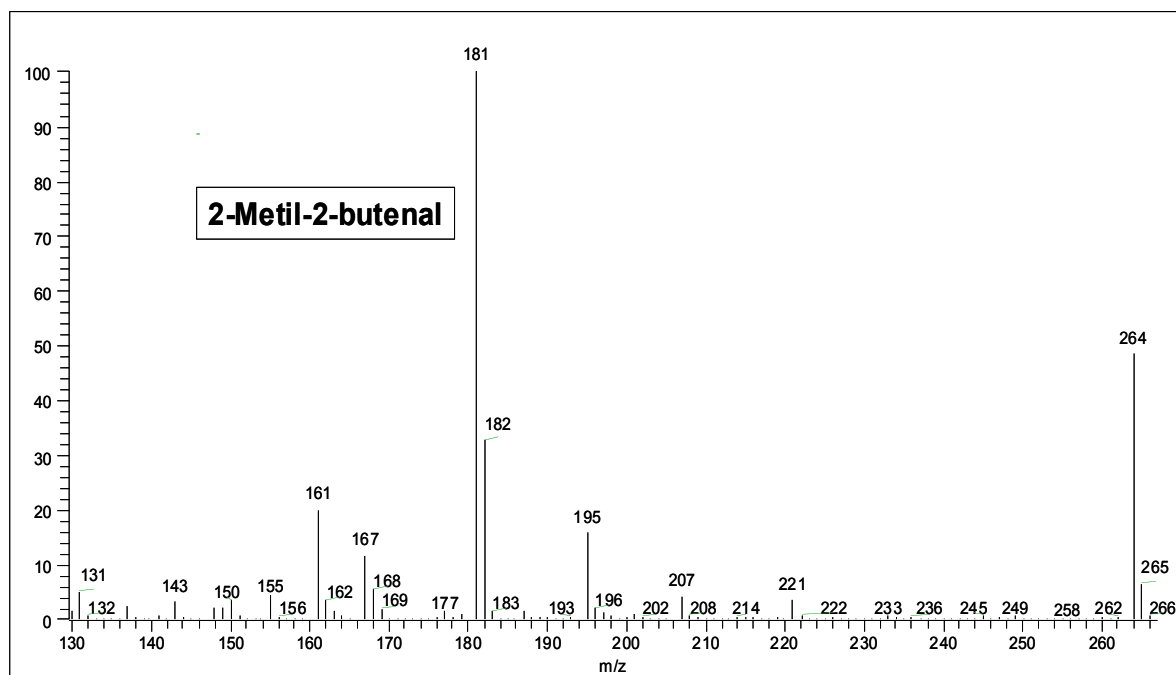
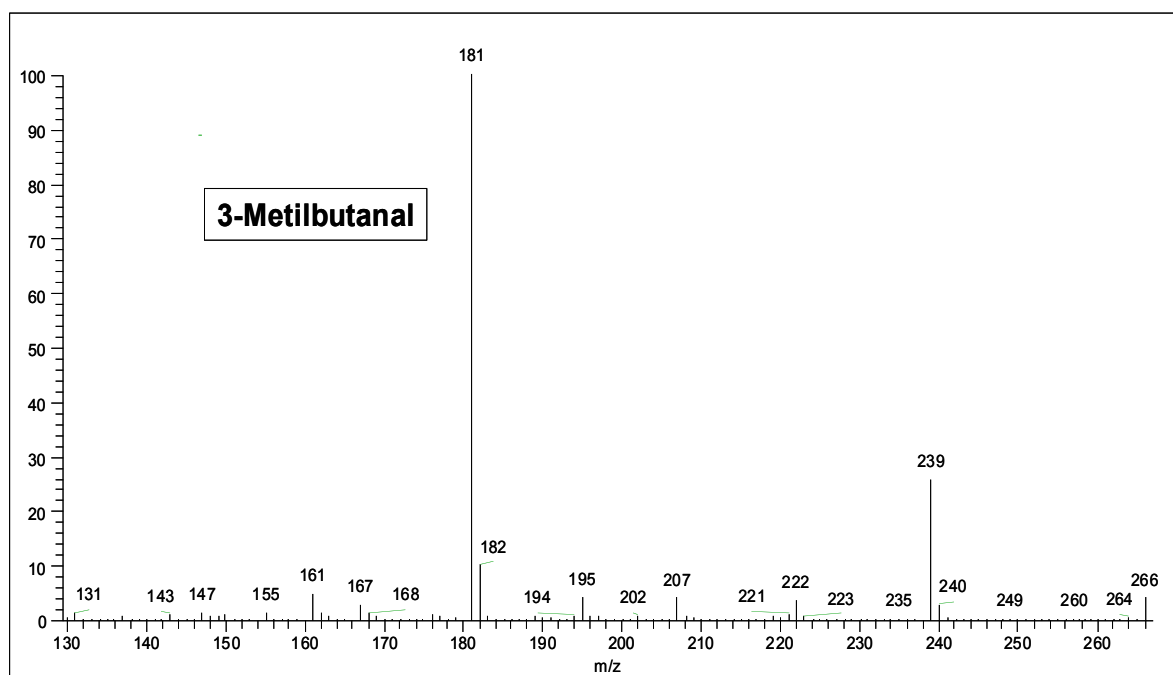


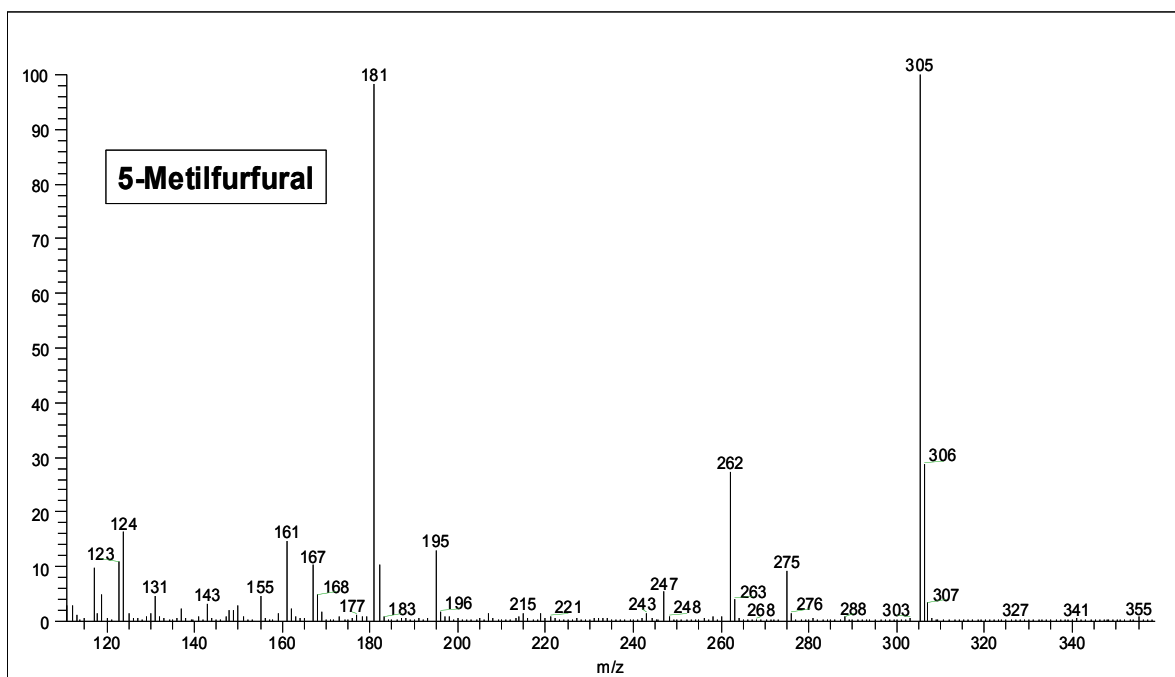
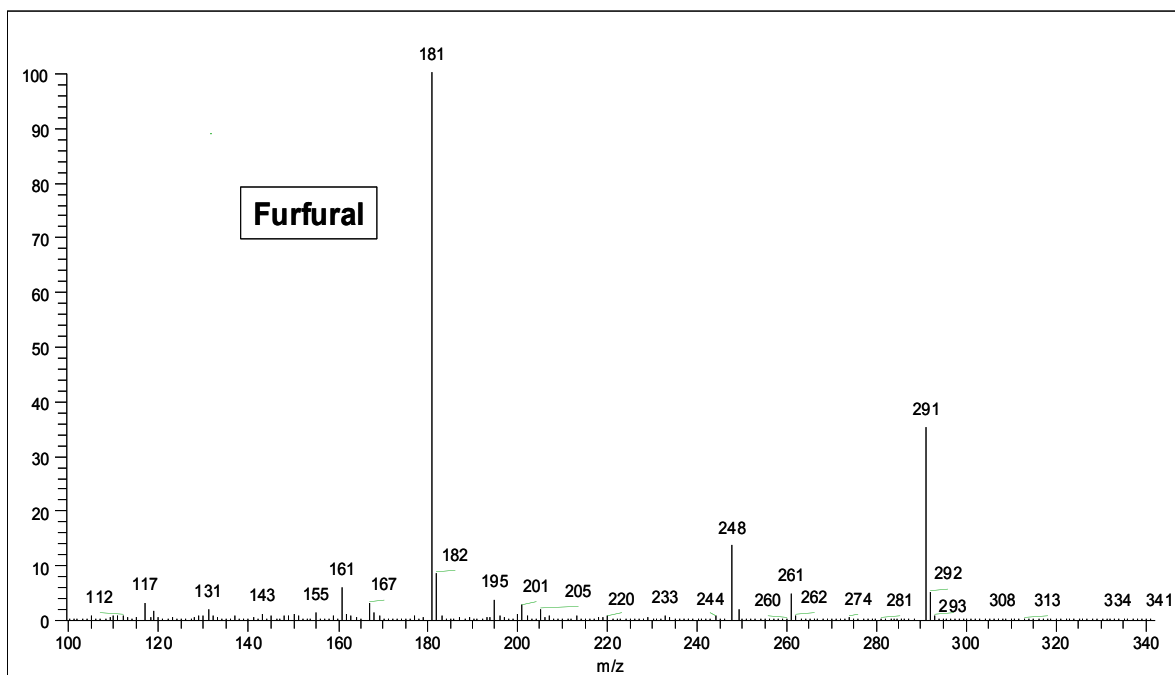


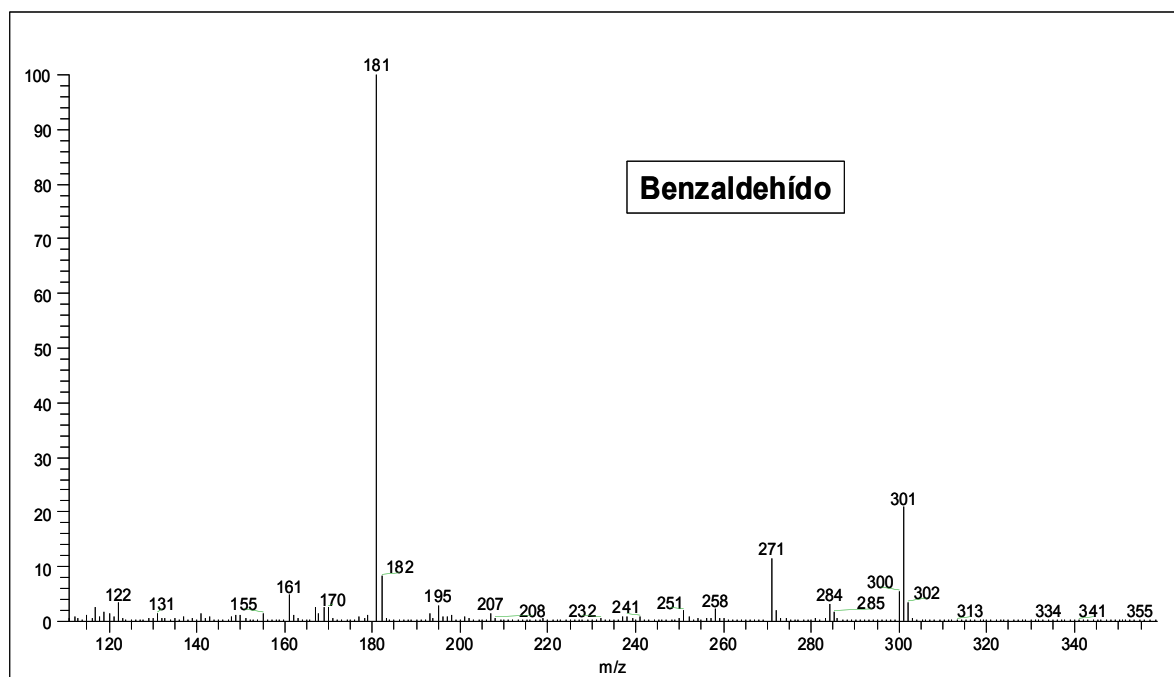
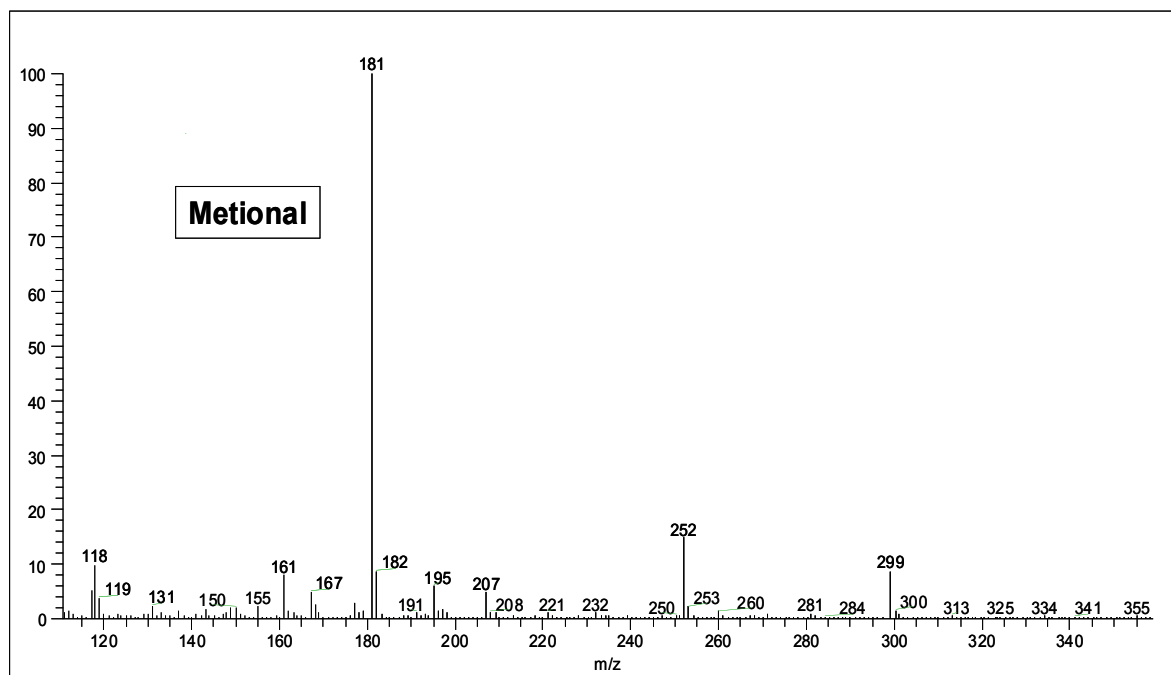


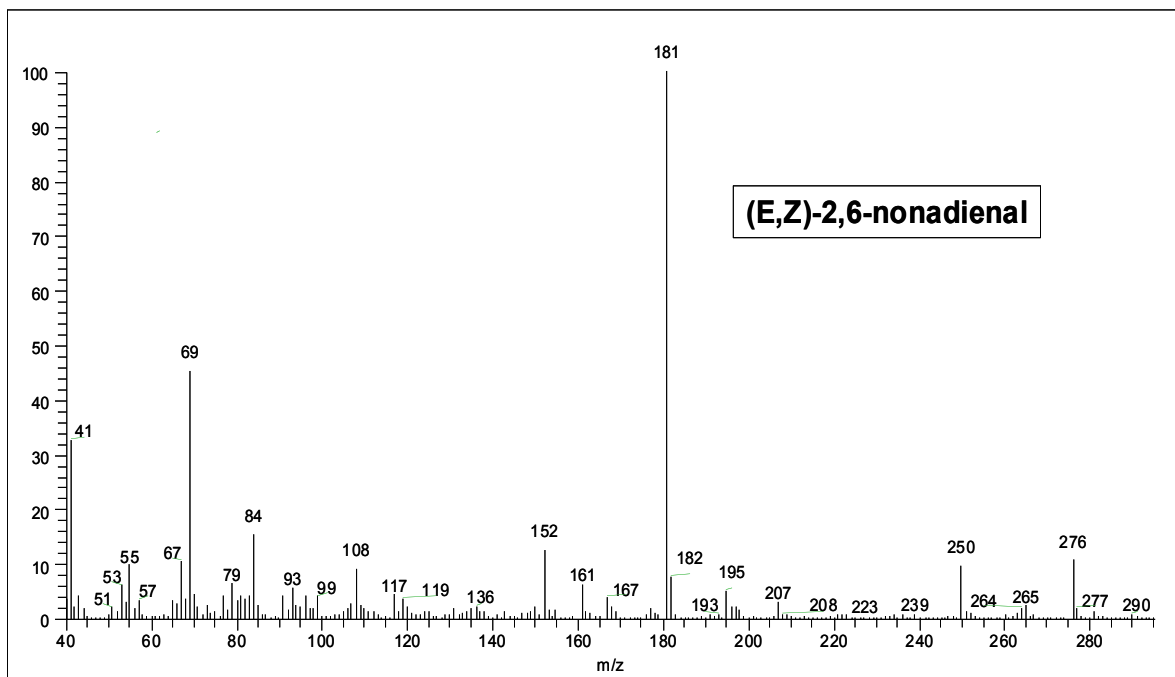
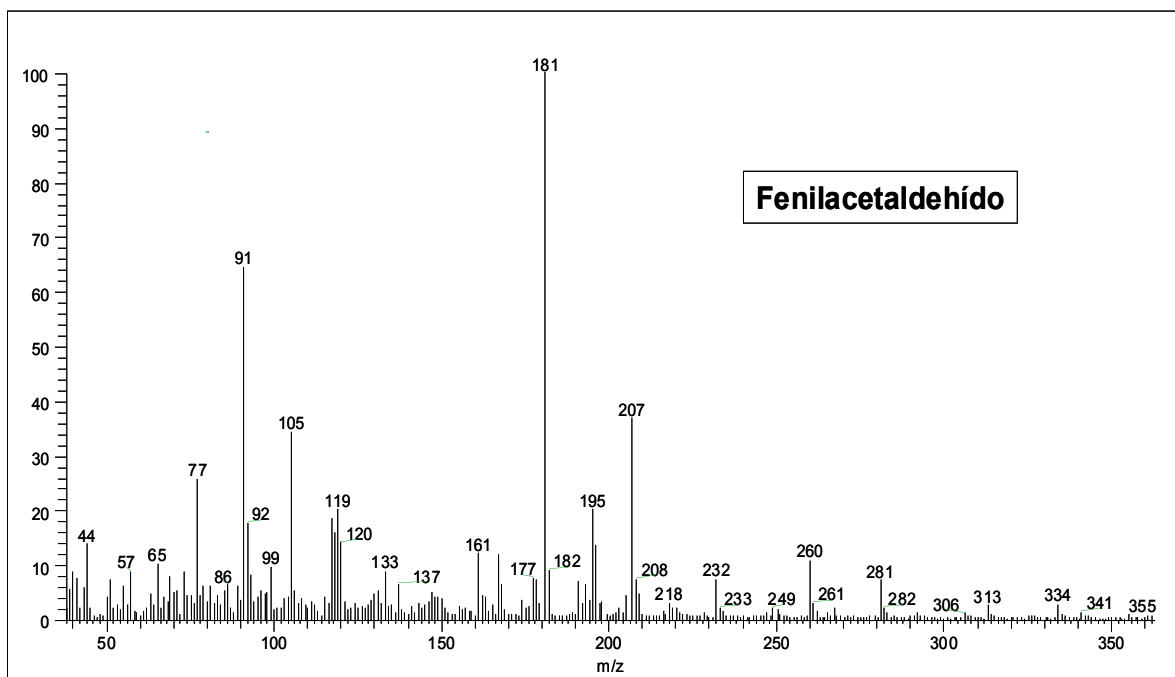














Capítulo 2: APLICACIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES EN ALIMENTOS DERIVADOS DE LA PESCA Y MECANISMOS QUE RIGEN SU ACTIVIDAD

2.1. INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE LA ADICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

2.1.1. Introducción

Los ácidos hidroxycinámicos son un tipo de compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en la naturaleza como productos del metabolismo de plantas. Entre éstos, los ácidos cafeico, o-cumárico y ferúlico son derivados del ácido cinámico que se diferencian estructuralmente en los sustituyentes sobre el anillo fenólico, mientras que el ácido clorogénico es un éster del ácido cafeico (Caf-OH) con el ácido quínico. Debido a sus propiedades antioxidantes, este tipo de compuestos se han aplicado como aditivos en múltiples matrices alimentarias, como pescado (Medina, Gallardo, González, Lois & Hedges, 2007), emulsiones (Almajano, Carbo, Delgado & Gordon, 2007), paté (Rey, Hopia, Kivikari & Kahkonen, 2005), o manteca de cerdo (Kortenska-Kancheva, Yanishlieva & Kyoseva, 2005). Como se ha mencionado en la introducción de esta memoria, su eficacia, examinada en diversas publicaciones (Cheng, Dai, Zhou, Yang & Liu, 2007, Gülçin, 2006, Medina, Gallardo, González, Lois & Hedges, 2007), depende de propiedades físico-químicas, como la polaridad, la capacidad reductora o la capacidad quelatante (Medina, Gallardo, González, Lois & Hedges, 2007), derivadas de sus diferencias estructurales.

En los últimos años se ha incrementado el interés por los compuestos polifenólicos procedentes de fuentes naturales y su utilización como aditivos antioxidantes en alimentos (Plumb, De Pascual-Teresa, Santos-Buelga, Cheynier & Williamson, 1998). La corteza de pino, el bagazo de uva y la corteza de Hamamelis pertenecen a este tipo de residuos ya que contienen una alta concentración de sustancias antioxidantes entre las que destacan las procianidinas con distintos grados de polimerización y galoización.

En este capítulo se expone el estudio llevado a cabo con ácidos hidroxycinámicos y extractos de polifenoles seleccionados procedentes de residuos naturales, con el objetivo de relacionar sus diferencias estructurales con la eficacia antioxidante sobre distintos productos de la pesca. En un primer bloque, se evaluó la actividad de los ácidos cafeico, clorogénico, o-cumárico y ferúlico sobre músculo picado de jurel almacenado en refrigerado y congelado. En el caso de los polifenoles procedentes de residuos naturales, el trabajo de investigación se enfocó hacia el estudio de la relación entre la efectividad antioxidante y las características estructurales de los polifenoles como el grado de polimerización y el porcentaje de galoización. Para ello se han

utilizado una serie de fracciones de procianidinas procedentes de corteza de pino (sin galoización), bagazo de uva (porcentaje de galoización medio) y corteza de Hamamelis (altamente galoizadas) con distintos grados de polimerización, evaluando su actividad tanto en sistemas modelo de emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado.

2.1.2. Experimental

2.1.2.1. Sustrato lipídico

1. Emulsiones.

Las emulsiones se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 1.2.2.2.1. del Capítulo 1. El contenido de la emulsión fue de un 10 % de aceite de hígado de bacalao (Fluka, New-Ulm, Swizerland) y de un 1 % de lecitina de soja (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

2. Pescado

En los experimentos descritos en este capítulo se utilizaron individuos de jurel (*Trachurus trachurus*) que fueron adquiridos en un mercado local de Vigo. Todas las muestras presentaron una calidad extra de frescura (DOCE, 1989).

2.1.2.2. Antioxidantes

1. Ácidos hidroxicinámicos

En los experimentos descritos en este capítulo, se utilizaron los ácidos cafeico, clorogénico, o-cumárico y ferúlico, adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). En la Tabla 2.1 se describen las propiedades físico-químicas en términos de capacidad antioxidante, quelatante y los coeficientes de partición aceite/agua de estos compuestos (Medina, Gallardo, González, Lois & Hedges, 2007).

<i>Antioxidante</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Coefficiente¹ de reparto aceite/agua</i>	<i>Capacidad² reductora</i>	<i>Capacidad³ quelatante</i>
Cafeico	180,2	0,3 ± 0,1	12,2	79,3 ± 0,7
Clorogénico	354,3	3,1 ± 0,3	4,5	77,5 ± 0,4
Cumárico	164,2	22,6 ± 8,3	0,6	-2,7
Ferúlico	194,2	49,6 ± 2,0	9,8	-2,1

¹ Porcentaje en aceite

² Capacidad reductora en μmol electrones/ mg antioxidante

³ Capacidad quelatante expresada como porcentaje de hierro ferroso (20 μM) quelatado por el compuesto fenólico (20 μM).

Tabla 2.1: Características físico-químicas de los diferentes ácidos hidroxicinámicos ensayados.

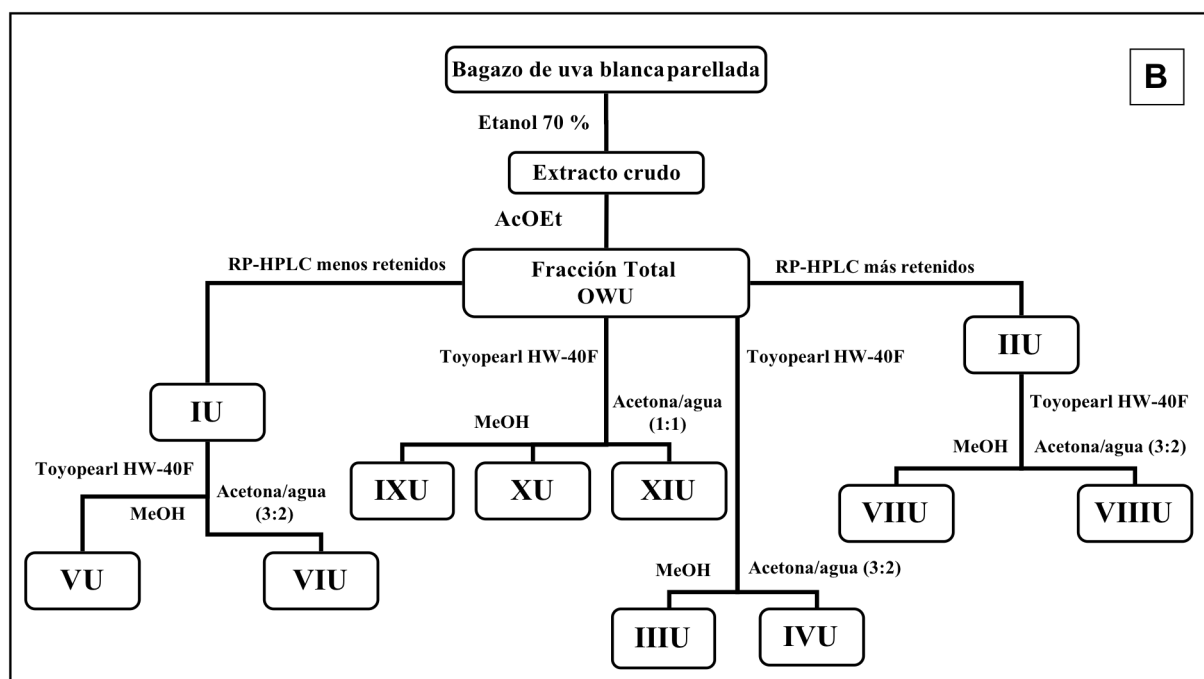
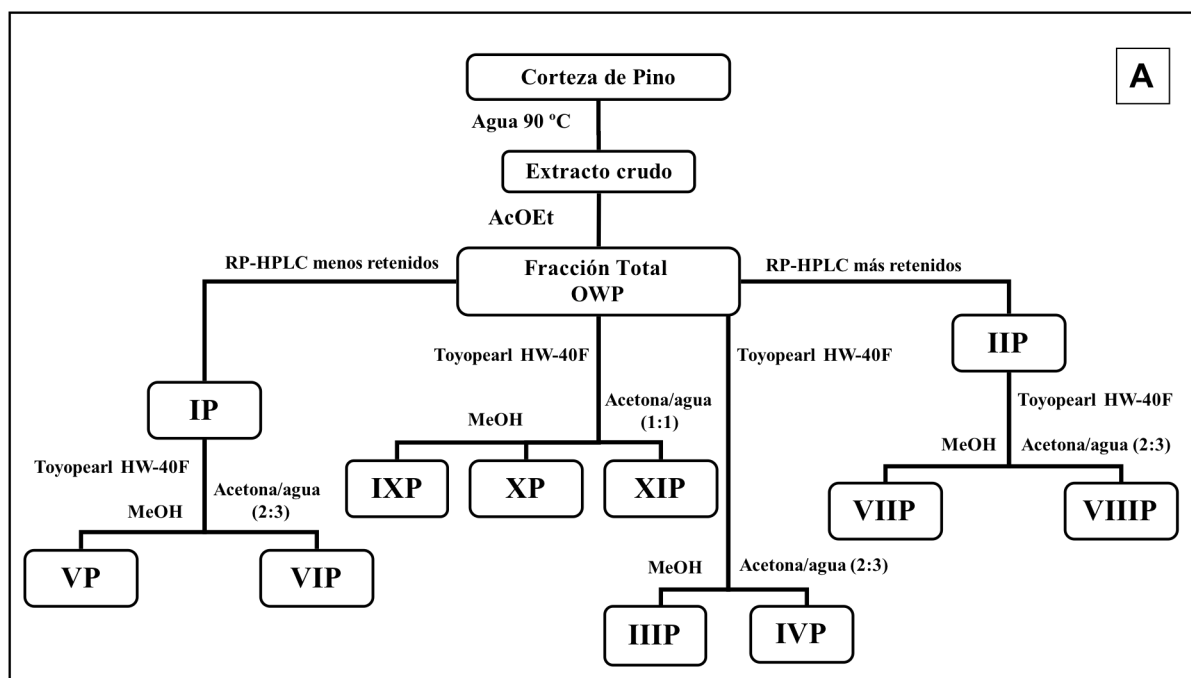
2. Compuestos fenólicos procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis.

Los extractos fenólicos de corteza de pino (OWP, IVP, IXP, XP y XIP), bagazo de uva (OWU, IVU) y corteza de Hamamelis (IVH) fueron cedidos por el IIQAB de Barcelona (CSIC). La metodología utilizada para la extracción y purificación de estas fracciones está recogida en los trabajos de Torres et al. (2002), Touriño et al. (2005) y Touriño et al. (2008) y se describe a continuación:

Para la obtención del extracto crudo se incubaron los residuos procedentes de pino, uva y Hamamelis, con una mezcla de agua-disolvente orgánico (dependiendo del residuo) (Fig. 2.1 A, B y C) durante 24 horas con agitación ocasional. El sólido fue filtrado dos veces a través de lana de vidrio y el disolvente orgánico se eliminó mediante evaporación a vacío. La fase sólida resultante fue liofilizada consiguiéndose de esta forma el extracto crudo. El sólido liofilizado se desgrasó con hexano y, tras la separación del disolvente orgánico por decantación, los polifenoles fueron extraídos con acetato de etilo. La fase orgánica se eliminó mediante evaporación a vacío y el residuo se resuspendió con agua y se filtró a través de un plato poroso. La disolución filtrada fue centrifugada y la fase acuosa fue desechada. Tras la liofilización del residuo sólido se obtuvieron los extractos totales (OW). En la Fig. 2.1 se muestran los procesos de obtención de las distintas fracciones. El contenido de las fracciones totales, obtenidas de cada residuo, se separó en dos fracciones (I y II) en función de su polaridad, mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución en fase reversa (Pre-RP-HPLC). La fracción I se arrastró con CH_3CN al 12 % y la fracción II con CH_3CN al 24 %. Los disolventes se eliminaron por evaporación a vacío y posterior liofilización. Las fracciones OW, I y II fueron fraccionadas mediante cromatografía de

exclusión por tamaños en columna utilizando una resina de Toyopearl TSK HW-40F de 32-63 μm de tamaño de partícula (TosoHass, Tokio, Japan). El fraccionamiento se llevó a cabo en dos etapas: una primera elución con MeOH permitió la obtención de los fenoles de menor tamaño (fracciones III, V y VII), mientras que una segunda con agua-acetona (2:3) arrastró los de mayor tamaño (fracciones IV, VI y VIII). Alternativamente, la fracción total (OW) fue más extensamente fraccionada mediante cromatografía de exclusión por tamaños para la obtención de las fracciones IX y X mediante la elución con MeOH y la fracción XI mediante la elución con agua-acetona (1:1). La composición polifenólica de cada una de las fracciones se muestra en la Tabla 2.2.

La Tabla 2.3 muestra los resultados de la caracterización química en términos de grado de polimerización y galoización (porcentaje de grupos galato esterificados a los oligómeros), capacidad quelatante, carácter hidrofílico-lipofílico y capacidad reductora. Las fracciones homólogas procedentes de corteza de pino y bagazo de uva presentaron valores similares de peso molecular y grado de polimerización. Las diferencias más importantes radican en el porcentaje de galoización ya que mientras que las fracciones de pino no están galoizadas, las fracciones de uva contienen un porcentaje de galoización intermedio (Tabla 2.3). Las fracciones procedentes de corteza de Hamamelis fueron obtenidas siguiendo la misma metodología utilizada para la obtención de los extractos procedentes de corteza de pino y el bagazo de uva. Sin embargo, la composición de la fracción IVH presentó una composición química muy diferente a la de sus homólogas. Mientras que los compuestos polifenólicos de las fracciones de pino y uva fueron fundamentalmente oligómeros de flavanoles, la IVH estuvo formada por monómeros de catequina y varios dímeros de procianidinas galoizadas con un grupo pirogalol (3 grupos adyacentes en un anillo fenólico) sobre el anillo B, además de un alto porcentaje de taninos hidrolizables (estructuras monoméricas de ácido gálico glicosilado) (Medina, Torres, & González, 2009).



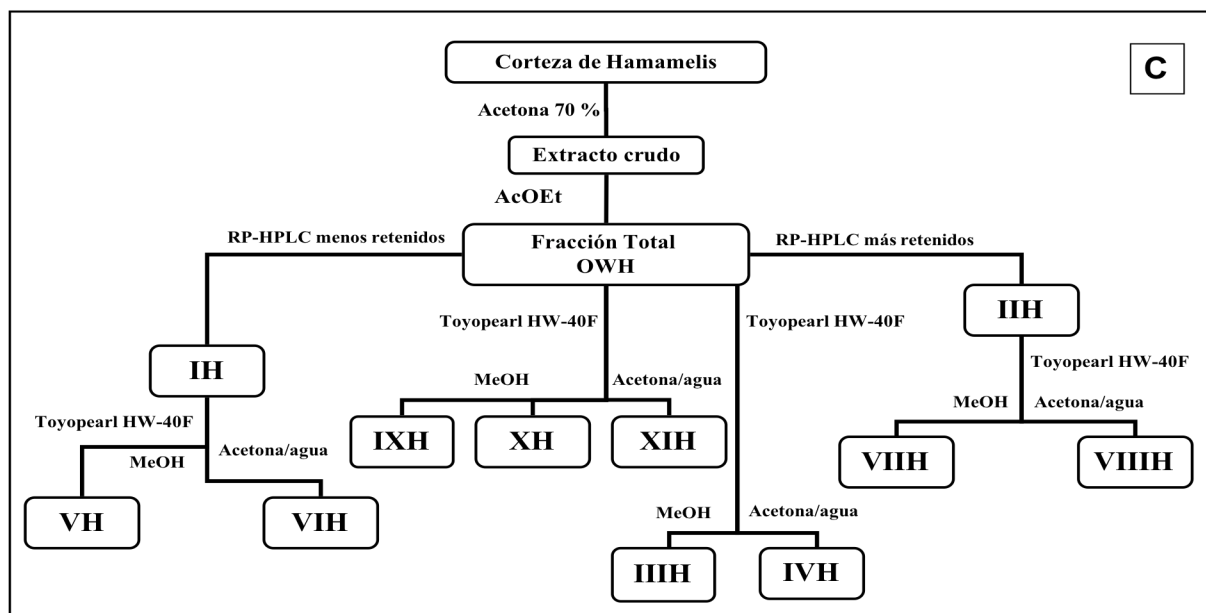


Figura 2.1: Esquema de extracción y fraccionamiento de los residuos de pino (A), uva (B) y Hamamelis (C).

<i>Fracción</i>	<i>Composición</i>	<i>Fracción</i>	<i>Composición</i>
I	Monómeros + oligómeros de flavanoles	VII	Monómeros de flavonoles
II	Flavonoles + oligómeros de flavanoles	VIII	Oligómeros de flavanoles
III	Monómeros de flavanoles + flavonoles	IX	Dímeros de flavanoles
IV	Oligómeros de flavanoles	X	Dímeros + Oligómeros de flavanoles
V	Monómeros de flavanoles	XI	Oligómeros de flavanoles
VI	Oligómeros de flavanoles		

Tabla 2.2: Composición fenólica de las distintas fracciones procedentes de corteza de pino y bagazo de uva.

<i>Fracción</i>	<i>Peso molecular medio</i>	<i>Grado de polimerización</i>	<i>Porcentaje de galoización</i>	<i>Coefficiente ¹ de reparto (aceite/agua)</i>	<i>Capacidad ² antiradicalaria (ensayo DPPH)</i>	<i>Capacidad ³ reductora</i>	<i>Capacidad ⁴ quelatante</i>
OWP	601	2,1	-	5,5 ± 2,0	12,5	3,6	48,7 ± 0,1
IVP	833	2,9	-	18,5 ± 3,0	16,8	5,6	77,4 ± 0,5
IXP	559	1,9	-	6,1 ± 0,4	16,8	4,4	44,1 ± 0,1
XP	639	2,2	-	8,1 ± 0,2	22,2	4,0	58,1 ± 0,5
XIP	999	3,4	-	18,5 ± 2,2	21,0	6,1	88,3 ± 0,1
OWU	552	1,7	15,0	20,1 ± 2,5	19,0	3,7	59,4 ± 0,3
IVU	880	2,7	25,0	24,7 ± 2,0	27,0	5,8	94,2 ± 0,3
IVH	900	1,6	70,0	29,9 ± 2,5	35,0	6,1	92,8 ± 3,6

¹ Porcentaje de antioxidante en aceite

² $(1/ED_{50}) \times 10^4$. ED_{50} estimado en µg de fracción/micromoles de DPPH (Torres et al.,2002, Touriño et al., 2005, Touriño et al., 2008)

³ Capacidad reductora en electrones/ mg antioxidante

⁴ Capacidad quelatante calculada a 20 µmol de antioxidante

Tabla 2.3: Caracterización físico-química de las distintas fracciones.

2.1.2.3. Determinación de la eficacia antioxidante en emulsiones de aceite de pescado en agua.

1. Oxidación de las emulsiones.

Las emulsiones fueron divididas en varios sistemas introduciéndolas en frascos erlenmeyer de 50 mL, provistos de tapón de rosca, y a continuación se añadieron los diferentes antioxidantes (Fig. 2.2). Los matraces se almacenaron en estufas a 40 °C con el objetivo de acelerar la oxidación. Para el seguimiento del proceso oxidativo se extrajeron alícuotas de muestra de los matraces para la determinación de hidroperóxidos conjugados, compuestos

volátiles o fluorescencia conjuntamente con el análisis sensorial. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

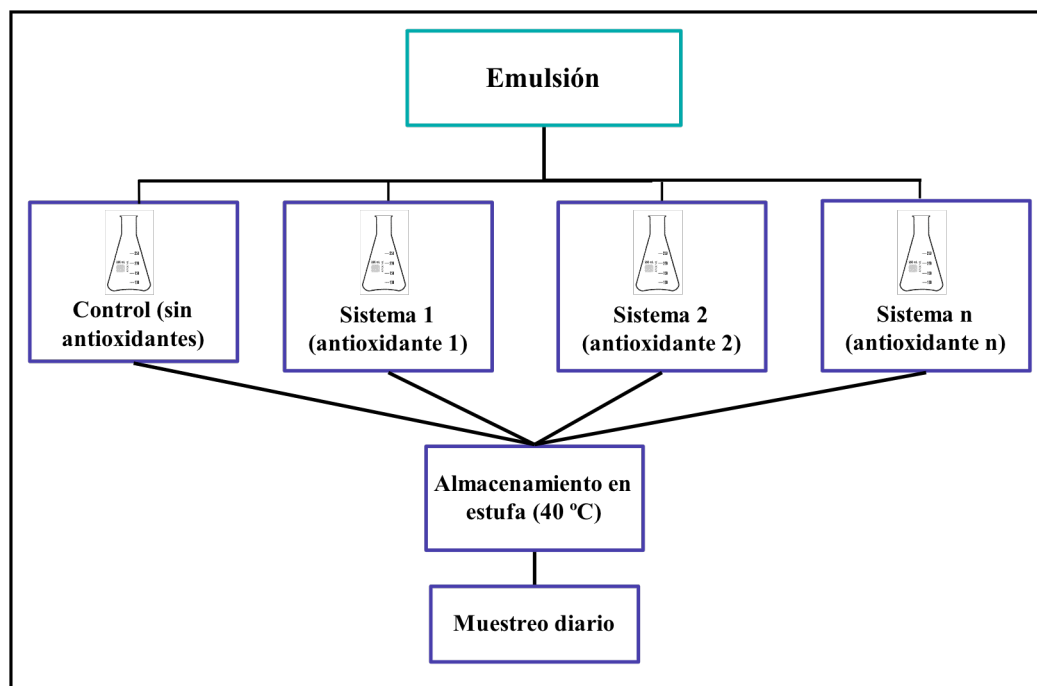


Figura 2.2: Esquema de muestreos en los experimentos realizados en emulsiones.

2. Determinación de los hidroperóxidos conjugados.

Para la determinación de los hidroperóxidos conjugados se siguió la metodología propuesta por la AOCS (1989). El método se basa en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 234 y 268 nm, que se corresponden con los máximos de absorción de los hidroperóxidos con dobles y triples enlaces conjugados, respectivamente. Se disolvieron porciones de emulsión (100 μ L durante el período de inducción, que se redujeron durante la etapa de propagación del proceso oxidativo), en 5 mL de EtOH absoluto y las disoluciones se agitaron durante 30 segundos con un Vortex. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA). Se empleó EtOH absoluto como blanco. El contenido de hidroperóxidos con dobles y triples enlaces conjugados se expresó en milimoles de hidroperóxido/Kg, según la ecuación mostrada el apartado 1.2.2.1.10 del Capítulo 1 de esta memoria.

3. Análisis de compuestos volátiles

El análisis de los compuestos volátiles formados a partir de la oxidación lipídica se llevó a cabo utilizando la metodología descrita en el Capítulo 1.2. de esta memoria. Brevemente, se introdujeron 0,5 mL de emulsión en un vial de SPME de 20 mL y los analitos fueron extraídos mediante HS-SPME, utilizando una fibra CAR/PDMS de 75 µm de espesor de fase e incubando la muestra durante 30 minutos a 60 °C. La desorción se llevó a cabo en el inyector de GC, de tipo split/splitless, a 300 °C durante 10 minutos. La separación y determinación cualitativa y semicuantitativa se realizó mediante GC acoplada a MS. El análisis semicuantitativo se realizó utilizando el 3-Metil-3-buten-1-ol como patrón interno. Para monitorizar el deterioro oxidativo, se realizó un seguimiento de la cinética de formación de 1-penten-3-ol y 2-etilfurano.

4. Determinación de los compuestos fluorescentes de interacción

Los compuestos fluorescentes de interacción surgen de la reacción de los productos secundarios de la oxidación, mayoritariamente aldehídos, con los grupos amino de la lecitina (Aubourg, 1999). Por tanto, estos compuestos, también denominados productos terciarios de la oxidación, se generan en las últimas etapas del proceso. Para monitorizar su evolución se determinó la fluorescencia a los pares de longitudes de onda: 345 nm (λ_{exc})/416 nm (λ_{em}) y 393 nm (λ_{exc})/463 nm (λ_{em}), de acuerdo con el método propuesto por Nielsen, Loliger & Hurrell (1985).

Los compuestos fluorescentes se determinaron en las disoluciones etanólicas de las emulsiones que se emplean para medir los dienos y trienos conjugados utilizando un Fluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-3B (Perkin-Elmer, Wilesley, MA, USA). El blanco se realizó con etanol absoluto. La fluorescencia de los compuestos de interacción de las muestras (F^n), se calculó mediante la siguiente relación entre las intensidades de fluorescencia de los dos pares de longitud de onda:

$$F^n = F^n_{(393/463)} / F^n_{(345/416)}$$

Como referencia se empleó una disolución de sulfato de quinina de 1 µg/mL, en ácido sulfúrico 0,05 M. El factor de fluorescencia relativo (δF) se obtuvo del cociente entre la fluorescencia correspondiente a la muestra (F^m) y la fluorescencia del sulfato de quinina (F^{sq}):

$$\delta F = F^m / F^{sq} = (F^m_{(393/463)} / F^m_{(345/416)}) \times (F^{sq}_{(345/416)} / F^{sq}_{(393/463)})$$

5. Análisis sensorial

Las emulsiones se retiraron de la estufa y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos antes del análisis. Éste fue realizado por un panel experto formado por cuatro personas entrenadas en la descripción de rancidez inmediatamente después de la apertura de los matraces donde estaban contenidas las muestras. Los panelistas se concentraron en la detección de los olores característicos de la oxidación de lípidos utilizando una escala del 1 al 9, correspondiendo el 1 a la no percepción de la rancidez y el 9 a la detección alta de los olores correspondientes a la misma.

2.1.2.4. Determinación de la eficacia antioxidante en músculo de pescado.

1. Preparación de los experimentos.

Los diferentes ejemplares de pescado fueron eviscerados y el músculo blanco fue separado de las espinas, la piel y el músculo rojo. El músculo fue picado en un homogeneizador-picador hasta un tamaño de partícula de 0,5 cm manteniéndose sobre hielo durante todo el proceso de preparación de muestra. En los experimentos donde se almacenó el músculo a 4 °C (almacenamiento en refrigerado) se añadieron 200 ppm de sulfato de estreptomicina para prevenir la degradación microbiana. El músculo picado se dividió en porciones según el número de sistemas y se añadieron los distintos antioxidantes.

En los experimentos con músculo refrigerado (Fig. 2.3) se tomaron porciones de 10 gramos de muestra que se introdujeron en matraces erlenmeyer de 50 mL y se almacenaron en una cámara refrigerada a 4 °C. En los experimentos en congelado las muestras fueron introducidas en bolsas de plástico y se almacenaron a -18 °C. Todos los análisis se realizaron por duplicado o triplicado. Dependiendo del experimento, la oxidación lipídica fue monitorizada con

distintos índices de seguimiento del deterioro oxidativo: PV, TBARS y/o volátiles además del análisis sensorial.

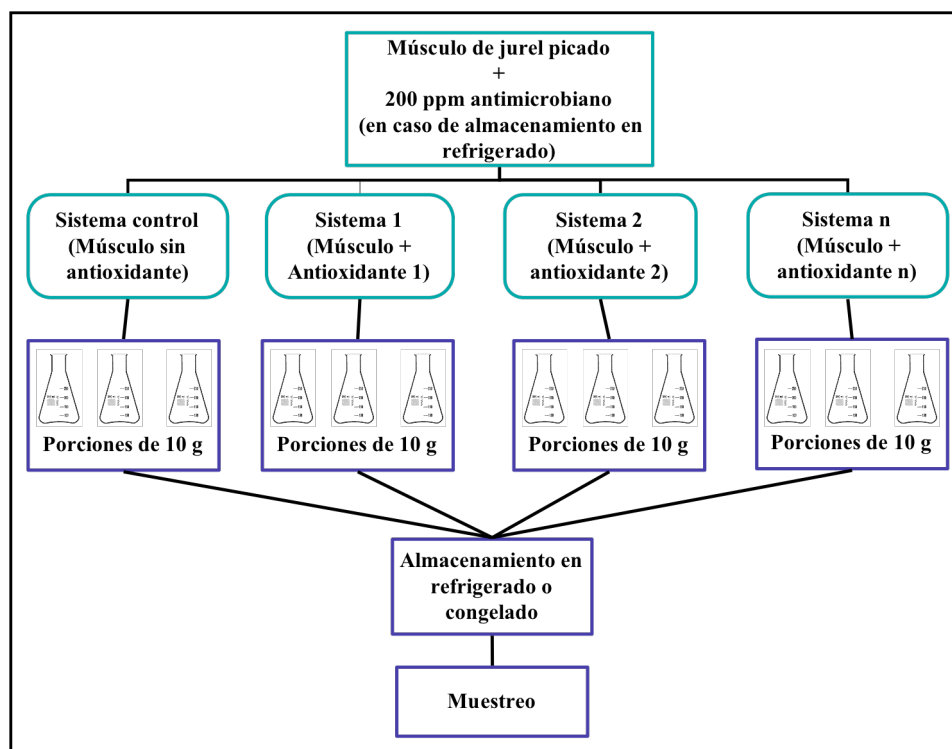


Figura 2.3: Esquema de muestreos en los experimentos con músculo de pescado.

2. Extracción de lípidos:

Para la extracción de los lípidos del músculo se utilizó el método propuesto por Bligh & Dyer (1959) descrito en el apartado 1.3.2.7. del Capítulo 1. El extracto lipídico se empleó para la determinación del contenido total de lípidos y para la determinación del PV.

3. Cuantificación del contenido total de lípidos

El contenido total de grasa se obtuvo mediante la determinación gravimétrica del residuo seco del extracto lipídico de diclorometano obtenido mediante extracción de Bligh & Dyer (1959), según la metodología de Herbes & Allen (1983) descrita en el apartado 1.3.2.8 del Capítulo 1.

4. *Análisis sensorial*

El análisis sensorial se llevó a cabo por un panel formado por 3-4 profesionales entrenados, siguiendo el baremo indicado en la correspondiente directiva europea (DOCE, 1989), según la metodología detallada en el apartado 1.3.2.10 del Capítulo 1.

5. *Determinación de peróxidos lipídicos. Índice de peróxidos (PV)*

La determinación del índice de peróxidos se realizó de acuerdo con el método propuesto por Chapman & Mackay (1949) empleando el extracto lipídico de la extracción Bligh & Dyer, siguiendo la metodología detallada en el Capítulo 1, apartado 1.3.2.11. de esta memoria.

6. *Determinación de malondialdehído. Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS).*

Este análisis se llevó a cabo de acuerdo con el método de Vyncke (1970) para la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) tal y como se describe en el apartado 1.3.2.12 del Capítulo 1.

7. *Análisis de compuestos volátiles*

Para la determinación de volátiles se utilizó la metodología desarrollada en el Capítulo 1.3. de esta memoria, basada en la extracción de los analitos mediante HS-SPME GC-MS. Brevemente, 3 g de músculo se homogeneizaron durante 2 minutos con 8 mL de agua saturada en sal. Tras separar las dos fases mediante centrifugación (3500 r.p.m., 10 min.), 6 mL del sobrenadante fueron introducidos en un vial de SPME y los volátiles fueron extraídos con una fibra CAR-PDMS de 75 µm de espesor de fase incubando la muestra durante 30 minutos a 60 °C. La desorción en el inyector del GC se llevó a cabo a 300 °C durante 10 minutos. El análisis semicuantitativo se realizó mediante el método del patrón interno usando el 3-Metil-3-buten-1-ol. La 2,3-pentanodiona y el 1-penten-3-ol fueron los volátiles elegidos para el seguimiento de la oxidación lipídica.

2.1.2.5. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía, o ANOVA (Sokal & Rohlf, 1981), ($p < 0,01$) y las medias se compararon con el método de la diferencia de los mínimos cuadrados (LSD, least-squares difference).

2.1.3. Resultados

2.1.3.1. Actividad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos en la inhibición de la oxidación lipídica en músculo de pescado.

1. Efectividad comparativa de los ácidos hidroxicinámicos en músculo de pescado refrigerado.

La efectividad comparativa de los ácidos hidroxicinámicos cafeico, clorogénico y ferúlico fue evaluada en músculo picado de jurel almacenado a 4 °C. Las muestras presentaron un contenido en grasa del $1,4 \pm 0,2$ % con respecto a la masa de músculo y los distintos antioxidantes fueron añadidos en una concentración de 10 ppm (p/p). El desarrollo de la oxidación fue monitorizado mediante los índices de PV y TBARS, y la detección sensorial de los olores asociados con la rancidez.

La Fig. 2.4 muestran las cinéticas de formación de los hidroperóxidos lipídicos y malondialdehído. El período de inducción de la formación de hidroperóxidos finalizó tras 3 días de almacenamiento en el caso de las muestras control mientras que, los sistemas suplementados con los antioxidantes mostraron períodos de inducción mayores y, por lo tanto, resultaron eficaces inhibiendo el deterioro oxidativo. Las diferencias entre la evolución de las cinéticas en los sistemas con ácidos hidroxicinámicos no fueron significativas a lo largo de todo el experimento. Los porcentajes de inhibición de la formación de peróxidos con respecto al control rondaron el 100 % en todas los sistemas con antioxidante, tras 6 días de almacenamiento (Tabla 2.4).

En el caso del índice TBARS, las muestras control incrementaron significativamente su nivel de aldehídos tras 1 día de almacenamiento (Fig. 2.4) coincidiendo con la detección organoléptica de la rancidez. El ácido clorogénico también se mostró como un antioxidante eficaz ya que a pesar de que las muestras en las que estaba contenido no incrementaron sus niveles de aldehídos hasta pasado tan sólo 1 día, la cantidad máxima de productos secundarios formados fue menor que en los controles (58 % de inhibición al finalizar el experimento). Las muestras con ácido ferúlico mostraron un período de inducción de 3 días, y la cantidad de aldehídos formada fue muy inferior a la de las muestras control, inhibiendo su formación en un 75 % (Tabla 2.4) tras 6 días. El Caf-OH fue el antioxidante más eficaz ya que no se observó un incremento significativo en los valores del índice TBARS ni la aparición de olores asociados a la rancidez, a lo largo de todo el experimento.

Los resultados mostraron que los tres ácidos hidroxycinánicos ensayados en músculo de jurel refrigerado resultaron efectivos inhibiendo la oxidación lipídica. La cinética de formación de productos secundarios reveló que los ácidos ferúlico y cafeico fueron los más efectivos, mostrando este último una actividad ligeramente mayor. El ácido clorogénico, empleado a igual concentración en peso, fue el menos eficaz de los tres.

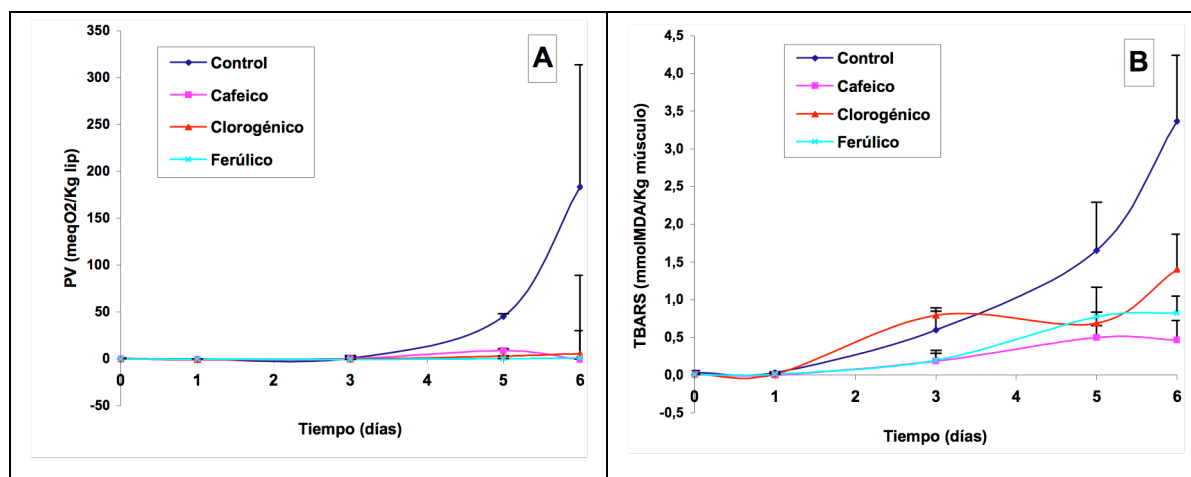


Figura 2.4: Cinética de formación de hidroperóxidos (A) y malondialdehído (B) en el experimento de músculo de jurel refrigerado.

Día	PV (%)			TBARS (%)		
	Cafeico	Clorogénico	Ferúlico	Cafeico	Clorogénico	Ferúlico
5	81,4 ± 5,7	94,3 ± 1,1	100,1 ± 0,2	69,7 ± 2,6	58,5 ± 48,4	53,3 ± 15,3
6	100,4 ± 0,2	97,1 ± 27,6	99,6 ± 32,3	86,1 ± 4,1	58,3 ± 25,4	75,5 ± 13,4

Tabla 2.4: Porcentaje de inhibición, con respecto a las muestras control, de la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica.

2. Efectividad de los ácidos hidroxycinámicos en músculo de pescado congelado.

La efectividad de los hidroxycinámicos fue ensayada sobre músculo de jurel picado y almacenado a -18°C, con un porcentaje de grasa del $2,3 \pm 0,2$ %. En lugar de ácido clorogénico se ensayó la eficacia del ácido o-cumárico además de los ácidos cafeico y ferúlico. Las muestras estuvieron almacenadas durante 3 meses y los muestreos fueron realizados mensualmente. Los antioxidantes fueron añadidos en una concentración de 100 ppm (p/p) y el seguimiento de la oxidación se llevó a cabo mediante los índices PV y TBARS y los análisis de compuestos volátiles y sensorial.

En la Fig. 2.5 se observa como la cinética de formación de peróxidos y aldehídos fue diferente en cada uno de los sistemas. Ambos índices mostraron valores muy bajos en todas las muestras al comienzo, pero tras el primer mes, en el sistema control se formó una gran cantidad de productos primarios y secundarios de la oxidación, coincidiendo con la aparición de los olores asociados a la rancidez oxidativa. Los tres ácidos fenólicos inhibieron de manera eficaz el deterioro oxidativo, ya que la velocidad de formación de los productos derivados fue, en todos los casos, menor que en las muestras control. Tras el primer mes de almacenamiento, los ácidos o-cumárico y ferúlico inhibieron la formación de peróxidos en un 38,6 % y un 24,5 % con respecto a los controles (Tabla 2.5). Los resultados obtenidos mediante el índice TBARS fueron similares ya que ambos antioxidantes redujeron la formación de aldehídos en un 31,6 % y en un 37,4 % (Tabla 2.5) respectivamente. El Caf-OH resultó el más eficaz ya que mostró un porcentaje de inhibición del 85,3 % en PV y del 85,6 % en TBARS (Tabla 2.5) retardando el comienzo de la oxidación hasta el segundo mes de almacenamiento (Fig. 2.5). El orden de eficacia antioxidante de los distintos sistemas, coincidió con la efectividad para inhibir la aparición de los olores asociados a la rancidez. Éstos fueron detectados, de manera incipiente, tras el primer mes de experimento en las muestras suplementadas con los ácidos o-cumárico y ferúlico. Las muestras con cafeico no mostraron olores característicos de la oxidación lipídica tras los primeros 30 días y la rancidez fue detectada tras el segundo mes. Los resultados obtenidos en el análisis de 1-penten-3-ol, elegido como marcador de la oxidación (Cap. 1.3) confirmó estos resultados (Fig. 2.6).

Por tanto, los ácidos cafeico, o-cumárico y ferúlico resultaron eficaces como aditivos antioxidantes inhibiendo la formación de compuestos primarios y secundarios de la oxidación lipídica en músculo de pescado picado y congelado. El experimento evidenció las diferencias entre las actividades de los tres antioxidantes, siendo el orden de eficacia cafeico > ferúlico = o-cumárico. Los porcentajes de inhibición de la formación de productos de la oxidación, medidos

durante la etapa de propagación, mostraron que la diferencia entre las actividades mostradas por ferúlico y cafeico fue mayor durante el almacenamiento de jurel en congelado que durante el almacenamiento en refrigerado.

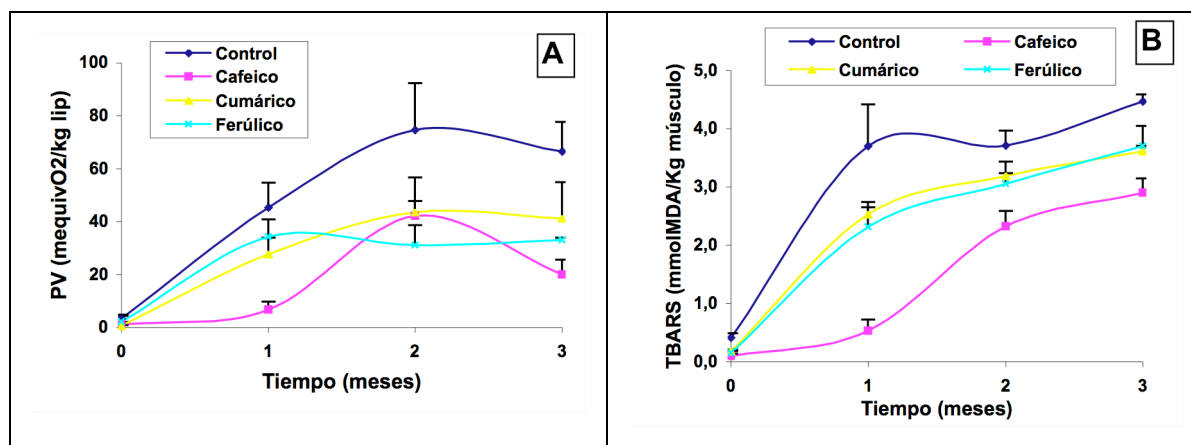


Figura 2.5: Cinética de formación de hidroperóxidos (A) y malondialdehído (B) en el experimento de músculo de jurel congelado.

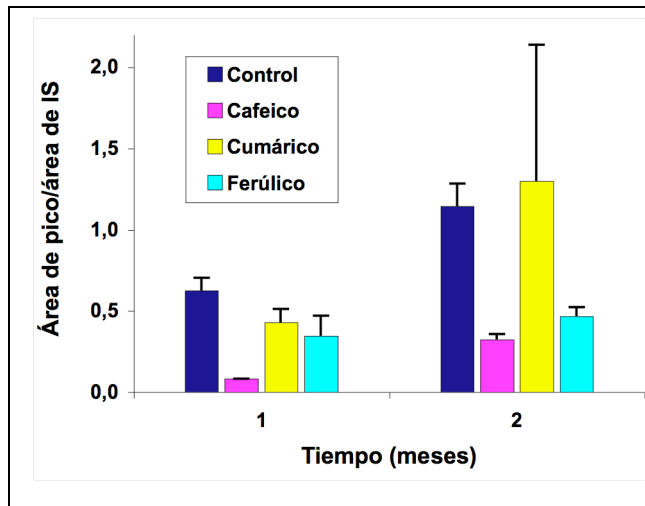


Figura 2.6: Cinética de formación de 1-penten-3-ol en el experimento de músculo de jurel congelado.

Mes	<i>PV (%)</i>			<i>TBARS (%)</i>		
	Cafeico	Cumárico	Ferúlico	Cafeico	Cumárico	Ferúlico
0	65,6 ± 31,5	81,3 ± 9,3	35,5 ± 98,5	75,5 ± 4,0	57,3 ± 13,8	63,3 ± 1,0
1	85,3 ± 6,6	38,6 ± 9,2	24,5 ± 28,3	85,6 ± 3,5	31,6 ± 10,9	37,4 ± 9,1
2	43,6 ± 11,2	41,7 ± 23,2	58,3 ± 18,3	37,4 ± 10,9	14,1 ± 6,5	17,8 ± 5,5

Mes	<i>1-Penten-3-ol (%)</i>		
	Cafeico	Cumárico	Ferúlico
0	82,4 ± 0,9	41,1 ± 1,6	67,9 ± 19,2
1	87,0 ± 1,0	31,5 ± 6,0	44,5 ± 15,6
2	71,7 ± 7,2	-13,3 ± 8,6	59,2 ± 6,9

Tabla 2.5: Porcentaje de inhibición de la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica con respecto a las muestras control.

2.1.3.2. Estudio de la actividad antioxidante en función de la estructura molecular en fracciones polifenólicas procedentes de residuos naturales.

En los estudios relacionados con la eficacia de los antioxidantes, se emplearon en primer lugar sistemas modelo de emulsiones de aceite de pescado en agua. Estos sistemas han demostrado un comportamiento muy similar a lo que ocurre en músculo (Pazos, Gallardo, Torres & Medina, 2005). A continuación se realizó el estudio de la relación entre estructura y actividad antioxidante de las fracciones de procianidinas en músculo picado refrigerado.

1. Estudio de la relación entre actividad antioxidante y grado de polimerización en emulsiones de aceite de pescado.

Las distintas fracciones procedentes de corteza de pino constituyen un buen modelo para el estudio de la influencia del grado de polimerización en la eficacia antioxidante de los polifenoles ya que al no estar galoizadas la única diferencia estructural se deriva del número de unidades que conforman los distintos oligómeros. En este experimento se estudió la eficacia de las fracciones IXP, XP y XIP, que presentan estructuras muy similares (monómeros y oligómeros de flavanoles), pero poseen grados de polimerización de 1,9, 2,2 y 3,4, respectivamente. La oxidación fue seguida mediante la evolución de los dienos y trienos conjugados y de los productos terciarios de la oxidación (Fig. 2.7 y 2.8).

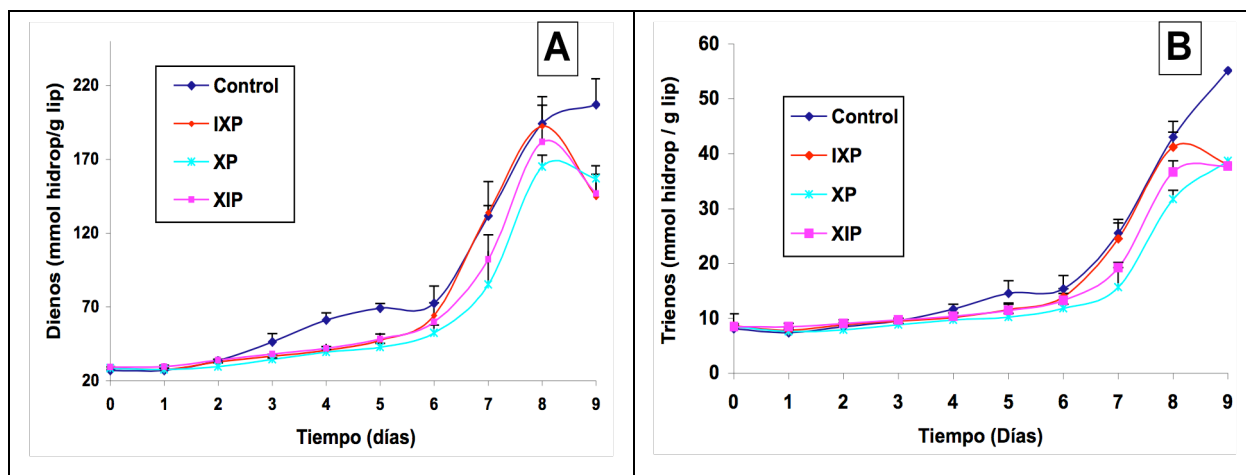


Figura 2.7: Cinética de formación de dienos (A) y trienos (B) conjugados en emulsiones de aceite de pescado en agua con diferentes antioxidantes.

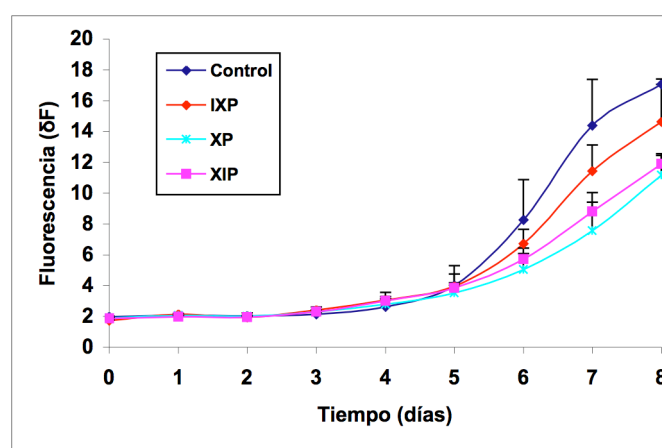


Figura 2.8: Cinética de formación de compuestos fluorescentes de interacción en emulsiones de aceite de pescado en agua con diferentes antioxidantes.

Las tres fracciones ensayadas resultaron eficaces inhibiendo la oxidación con respecto a las muestras sin antioxidantes (Fig. 2.7A), pero la actividad fue distinta. Todos los sistemas mostraron un período de inducción de aproximadamente 5 días y la velocidad de formación de dienos y trienos fue mayor en las muestras con la fracción IXP en comparación con las restantes. Las fracciones XP y XIP mostraron una actividad similar siendo la velocidad de formación de

hidroperóxidos ligeramente menor en las muestras con la fracción XP. Esta fracción inhibió la formación de dienos y trienos en un 35 % y un 38 % respectivamente (Tabla 2.6), tras 7 días de almacenamiento (durante la etapa de propagación), mientras que los porcentajes de inhibición en el sistema con XIP fueron de tan solo el 22 % y el 25 %. La cinética de formación de productos terciarios mostró unos resultados muy similares (Fig. 2.8). De nuevo, la fracción XP, con un grado de polimerización intermedio, fue la más efectiva ya que disminuyó de manera más eficaz la formación de productos de interacción, en comparación con las IXP y XIP. Los porcentajes de inhibición tras 7 días de almacenamiento fueron 21 % y 39 % para las fracciones IXP y XIP mientras que la XP inhibió la formación de compuestos fluorescentes en un 47 % con respecto a las muestras sin antioxidantes.

Los resultados obtenidos en este estudio, evidenciaron la relación existente entre el grado de polimerización y la efectividad antioxidante en emulsiones de aceite de pescado, mostrando un máximo para fracciones con un grado de polimerización intermedio.

Día	<i>Dienos (%)</i>			<i>Trienos (%)</i>		
	IXP	XP	XIP	IXP	XP	XIP
6	11,2 ± 1,5	27,5 ± 2,6	17,4 ± 1,9	9,5 ± 0,8	23,1 ± 1,3	13,6 ± 1,1
7	-1,6 ± 0,3	35,3 ± 13,9	22,3 ± 1,2	3,8 ± 0,2	38,4 ± 1,8	24,7 ± 1,5
8	0,7 ± 0,1	14,9 ± 0,7	6,3 ± 0,3	4,3 ± 0,4	26,3 ± 2,9	14,8 ± 0,4

Día	<i>Fluorescencia (%)</i>		
	IXP	XP	XIP
6	18,5 ± 2,5	39,0 ± 7,9	30,9 ± 3,8
7	20,6 ± 3,0	47,5 ± 11,5	38,8 ± 5,4
8	14,3 ± 2,4	34,5 ± 4,2	30,3 ± 1,3

Tabla 2.6: Porcentajes de inhibición de la formación de compuestos primarios (dienos y trienos conjugados) y terciarios (fluorescencia) de los distintos antioxidantes con respecto a las muestras control.

2. Evaluación de la influencia de la galoización en la actividad antioxidante en emulsiones de aceite de pescado.

Con el objeto de evaluar la importancia de la galoización en la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas, se ensayó la eficacia de fracciones homólogas de pino y uva. Las fracciones OWU y IVU han sido previamente seleccionadas en nuestro grupo como las más eficaces entre una batería de fracciones procianidínicas procedentes de bagazo de uva (Pazos, 2005, Pazos, Gallardo, Torres & Medina, 2005). La comparación con sus homólogas procedentes de corteza de pino (con un grado de polimerización similar y no galoizadas) permite evaluar la importancia de la presencia de grupos galato esterificados en la actividad antioxidante. Los antioxidantes fueron suplementados en una concentración de 100 ppm (p/p), y las muestras fueron incubadas a 40 °C durante 7 días. El seguimiento de la oxidación se llevó a cabo mediante el análisis de los dienos y trienos conjugados (Fig. 2.9) y los productos terciarios de interacción (Fig. 2.10).

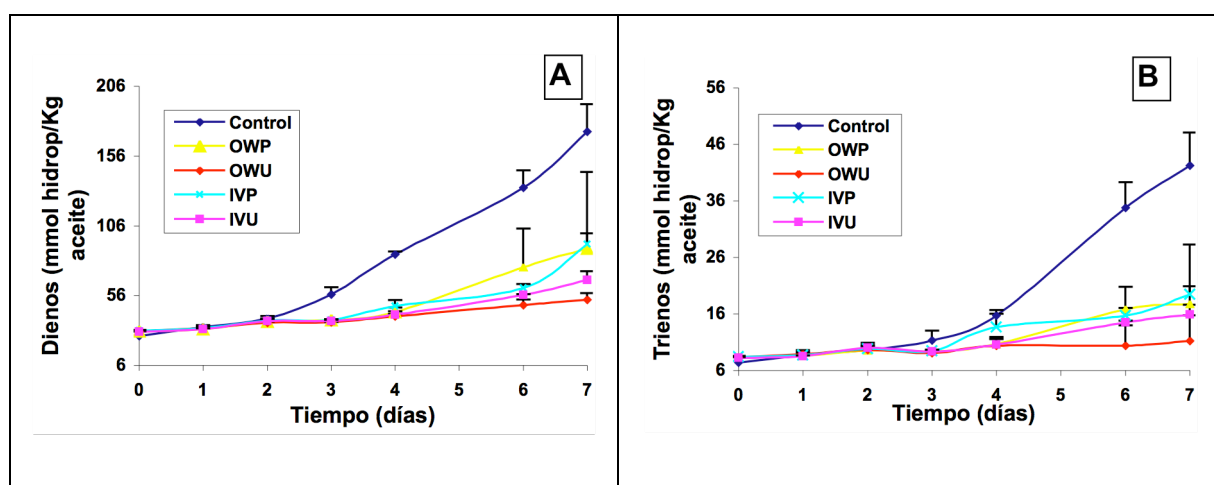


Figura 2.9: Formación de los dienos (A) y trienos (B) conjugados durante la incubación de emulsiones de aceite de pescado con antioxidantes procedentes de corteza de pino y bagazo de uva.

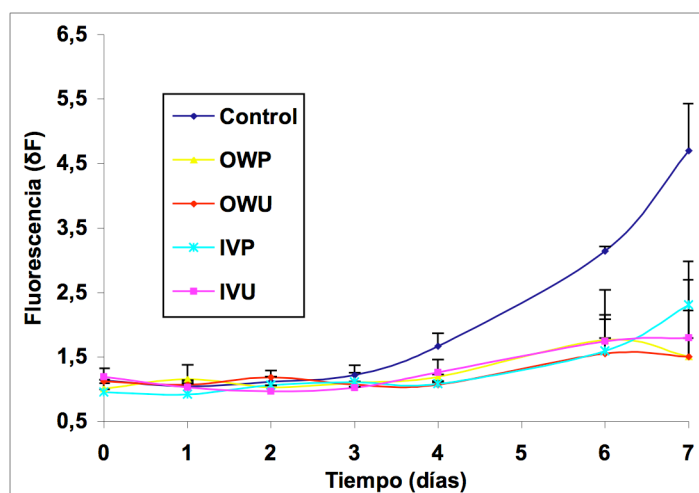


Figura 2.10: Formación de compuestos fluorescentes de interacción en los distintos sistemas.

Las muestras control experimentaron un incremento significativo de la oxidación tras el segundo día de almacenamiento mostrando una cinética de formación de hidroperóxidos con dienos conjugados más rápida que en el caso de los trienos. La detección sensorial de la rancidez se produjo tras en el tercer día de experimento. Todos los antioxidantes resultaron eficaces inhibiendo la oxidación con respecto a las muestras control pero las fracciones de pino (OWP y IVP) fueron menos eficaces que sus homólogas de uva. El sistema con OWP mostró un período de inducción de aproximadamente 4 días mientras que la IVP mostró un ligero incremento de dienos y trienos conjugados a partir del tercer día de almacenamiento. Durante la etapa de propagación de la oxidación (en el sexto día), la fracción OWP mostró unos porcentajes de inhibición con respecto a las muestras control del 43 % y del 51 % (Tabla 2.7) en la formación de dienos y trienos respectivamente. La fracción IVP inhibió la formación de dienos en un 54 % y en un 55 % en el caso de los trienos en el mismo período de almacenamiento (Tabla 2.7).

Las fracciones de uva (OWU y IVU), con un porcentaje de galoización medio (Tabla 2.7), resultaron más eficaces que sus homólogos procedentes de corteza de pino. Al igual que éstas, la fracción total (OWU) mostró una mayor actividad que la fracción IVU. El incremento de dienos y trienos conjugados se produjo tras 4 días de almacenamiento en el caso de la IVU, pero la velocidad de formación fue menor que en el sistema OWP (Fig. 2.9). La fracción total de uva (OWU) fue la más efectiva ya que fue en la que se observó un menor incremento de los productos de oxidación durante los 7 días de duración del experimento. En el sexto día, la

fracción OWU mostró los mayores porcentajes de inhibición (69 % y 70 % en dienos y trienos respectivamente) (Tabla 2.7). Los resultados mostrados en la cinética de los compuestos fluorescentes fueron ligeramente distintos (Fig. 2.10). De nuevo, todas las fracciones se mostraron eficaces inhibiendo la formación de compuestos terciarios pero las diferencias entre los distintos sistemas no fueron significativas a lo largo de todo el muestreo.

Día	<i>Dienos conjugados (%)</i>				<i>Trienos conjugados (%)</i>			
	OWP	OWU	IVP	IVU	OWP	OWU	IVP	IVU
4	48,3 ± 3,1	52,0 ± 3,0	43,7 ± 3,9	50,5 ± 2,5	32,2 ± 3,1	33,8 ± 4,9	12,8 ± 2,8	32,3 ± 2,7
6	42,6 ± 15,3	62,9 ± 3,6	54,0 ± 2,5	57,8 ± 0,5	51,5 ± 12,1	70,2 ± 24,3	54,7 ± 4,4	58,2 ± 1,1
7	48,2 ± 29,5	69,3 ± 5,0	46,4 ± 3,7	61,1 ± 5,4	57,9 ± 34,2	73,4 ± 29,1	54,1 ± 4,0	62,4 ± 6,8

Día	<i>Fluorescencia (%)</i>			
	OWP	OWU	IVP	IVU
4	28,6 ± 0,8	35,8 ± 1,0	35,1 ± 1,4	24,4 ± 3,8
6	43,9 ± 19,3	50,6 ± 19,4	49,3 ± 6,1	44,5 ± 8,7
7	68,0 ± 54,1	68,0 ± 13,2	50,8 ± 14,8	61,8 ± 14,7

Tabla 2.7: Porcentajes de inhibición de la oxidación lipídica de las fracciones de corteza de pino y bagazo de uva en emulsiones de aceite de pescado en agua.

Por último, la detección los olores asociados a la rancidez se produjo el día 6 en ambos sistemas con fracciones procedentes de corteza de pino y el día 7 en las muestras con fracción IVU. En las muestras con OWU no se detectó rancidez durante los 7 días de duración del experimento.

Puede concluirse por tanto, que la presencia de grupos galato esterificados en la estructura de las procianidinas influyó de manera importante en la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas en emulsiones de aceite de pescado resultando las fracciones galoizadas más eficaces que las no galoizadas.

3. Evaluación de la eficacia de fracciones procedentes de pino y uva frente a fracciones altamente galoizadas procedentes de corteza de Hamamelis en emulsiones de aceite de pescado.

Tras comprobar la importancia de la galoización en la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas, se evaluó comparativamente la eficacia de las fracciones IVP y IVU frente a la IVH, que contiene un alto porcentaje de grupos galato esterificados en su estructura.

Las fracciones procedentes de corteza de pino y bagazo de uva presentan una composición química similar (oligómeros de flavanoles) pero difieren en la cantidad de grupos galato esterificados en su estructura. La fracción IVH, posee una composición química diferente a la de las anteriores, compuesta por dímeros de catequinas y taninos hidrolizables pero con un alto porcentaje de galoización (Medina, Torres, & González, 2009).

De nuevo, las emulsiones con (100 ppm) y sin antioxidantes fueron incubadas a 40°C durante 7 días, y el seguimiento de la oxidación se llevó a cabo mediante el análisis de los dienos y trienos conjugados (Fig. 2.11), volátiles (Fig. 2.12) y el análisis sensorial.

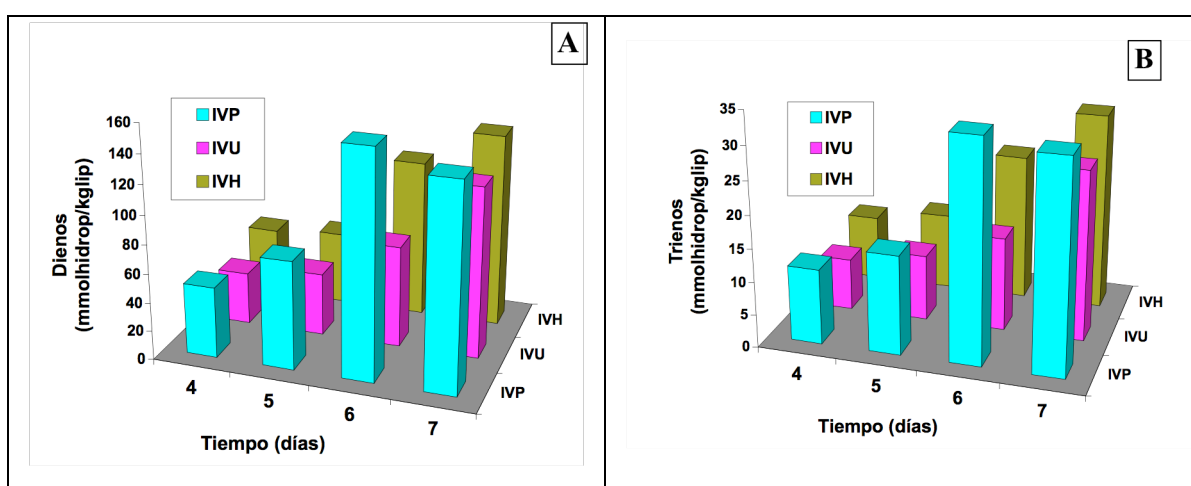


Figura 2.11: Cinética de formación de dienos (A) y trienos (B) conjugados durante el almacenamiento de las emulsiones a 40 °C.

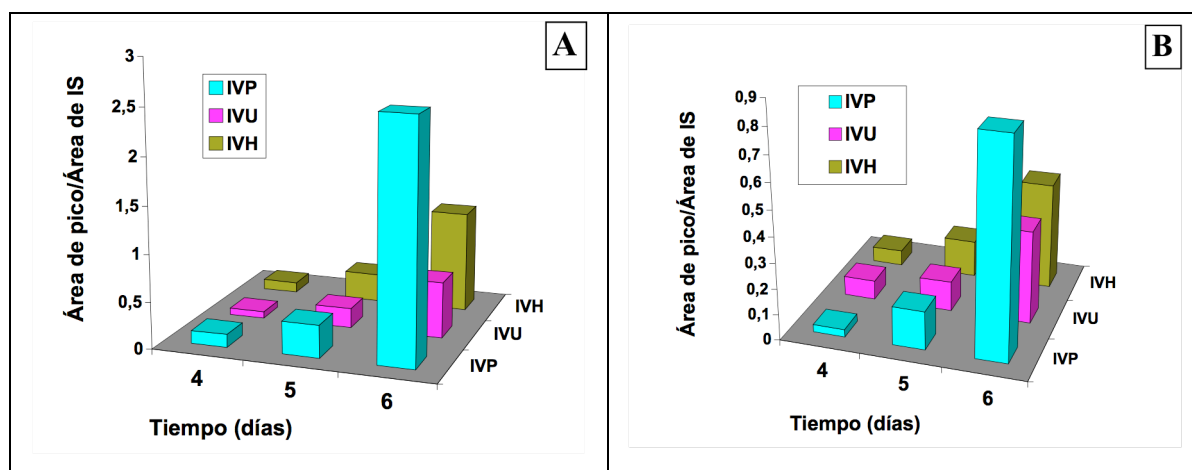


Figura 2.12: Cinética de formación de 1-penten-3-ol (A) y 2-etilfurano (B) durante el almacenamiento de las emulsiones a 40 °C.

La eficacia antioxidante mostró el orden $IVU > IVH > IVP$ con períodos de inducción muy similares (alrededor de 5 días). La velocidad de formación de productos de oxidación fue muy diferente en cada uno de los sistemas. Tanto dienos y trienos conjugados como volátiles se formaron en mayor cantidad en las muestras con IVP. Las emulsiones con IVU y IVH mostraron velocidades de formación de dienos y trienos diferentes. En el sexto día de experimento, los porcentajes de inhibición de las muestras con fracción de pino resultaron negativos (mayor formación de productos de la oxidación que en el sistema control) (Tabla 2.8). La fracción IVU mostró una mayor actividad antioxidante que la IVH, medida tanto mediante la formación de dienos y trienos como de volátiles (Tabla 2.8). La IVU inhibió la formación de dienos y trienos conjugados en un 39 % y un 37 % respectivamente, tras 6 días de almacenamiento. En el caso de las muestras con IVH la inhibición no llegó al 5 % en la formación de productos primarios (Tabla 2.8). Sin embargo, ambas fracciones mostraron una eficacia similar inhibiendo la formación de volátiles (Fig. 2.12). Como un ejemplo, los porcentajes de inhibición de la formación de 2,3-pentanodiona fueron 46 y 37 % para IVU y IVH respectivamente (Tabla 2.8), no pudiéndose diferenciar la efectividad de ambas fracciones de manera significativa. El análisis sensorial se correlacionó con la cinética de formación de volátiles. La detección del olor incipiente asociado a la rancidez se produjo en el cuarto día de almacenamiento en el sistema sin antioxidantes mientras que en los sistemas con antioxidantes no fue detectado hasta el último día de almacenamiento.

Los resultados obtenidos en este experimentos confirman la importancia conjunta del grado de polimerización y el porcentaje de galoización en la actividad antioxidante de las procianidinas. La fracción IVH no fue la que presentó mayor actividad a pesar de estar altamente galoizada, confirmando que este no es la única variable que determina la eficacia antioxidante de las procianidinas en emulsiones.

Día	<i>Dienos conjugados (%)</i>			<i>Trienos conjugados (%)</i>		
	IVP	IVU	IVH	IVP	IVU	IVH
5	1,1 ± 0,4	42,8 ± 3,0	33,8 ± 1,1	0,0 ± 0,0	33,9 ± 7,4	23,1 ± 0,3
7	-1,0 ± -0,3	15,9 ± 1,4	4,6 ± 0,8	-2,3 ± -0,7	17,5 ± 1,8	4,7 ± 0,9
Día	<i>1-Penten-3-ol (%)</i>			<i>2-Etilfurano (%)</i>		
	IVP	IVU	IVH	IVP	IVU	IVH
4	9,5 ± 8,8	53,4 ± 14,2	26,8 ± 12,0	77,3 ± 34,4	41,2 ± 14,0	52,1 ± 39,4
5	29,2 ± 19,4	57,2 ± 8,3	38,3 ± 16,4	59,6 ± 42,4	68,6 ± 40,9	61,3 ± 24,4
6	-181,8 ± 91,5	33,7 ± 15,2	-20,7 ± 7,4	-25,1 ± 8,9	45,9 ± 34,8	37,5 ± 1,0

Tabla 2.8: Porcentajes de inhibición de la formación de los distintos productos de la oxidación lipídica con respecto a las muestras control.

4. Estudio de la relación entre actividad antioxidante y grado de polimerización en músculo de pescado.

Al igual que en el caso de las emulsiones, se evaluó la influencia del grado de polimerización en la actividad antioxidante sobre músculo de jurel refrigerado ($3,6 \pm 0,4$ % de grasa (p/p)) utilizando las fracciones no galoizadas IXP, XP y XIP (100 ppm p/p). Como se ha indicado anteriormente estas fracciones solo difieren en el grado de polimerización. La oxidación fue monitorizada mediante la formación de peróxidos (PV) y aldehídos (TBARS). La Fig. 2.13 y la Tabla 2.9 muestran que no existió una relación directa entre el grado de polimerización de las procianidinas y la actividad antioxidante en músculo de pescado. Al igual que en las emulsiones de aceite de pescado, la fracción XP, con un grado de polimerización de 2,2, fue la más eficaz inhibiendo la oxidación seguida de la IXP y la XIP. La Tabla 2.9 muestra los porcentajes de inhibición de la formación de compuestos primarios (PV) y secundarios (TBARS) de la oxidación con respecto a los controles. La inhibición de la formación de peróxidos tras tres días de experimento fue del 54 % en las muestras con fracción XP, mientras que para muestras con las fracciones IXP y XIP fue del 43 % y 27 % respectivamente. En el caso de los aldehídos, el porcentaje de inhibición fue de un 53 %, utilizando la fracción XP mientras que en las restantes muestras no se superó el 30 % (Tabla 2.9).

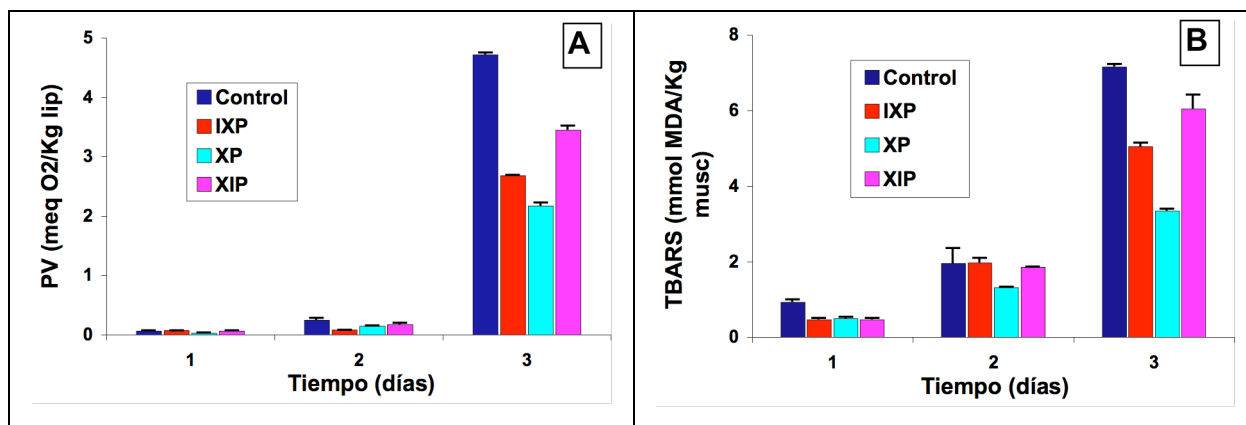


Figura 2.13: Cinética de formación de hidroperóxidos (A) y malondialdehído (B) en músculo de jurel refrigerado con diferentes antioxidantes.

La aparición de la rancidez, detectada mediante el análisis sensorial, no se produjo hasta el tercer día de almacenamiento y no se apreciaron diferencias entre los distintos sistemas.

Día	PV (%)			TBARS (%)		
	IXP	XP	XIP	IXP	XP	XIP
3	43,1 ± 2,2	53,9 ± 14,1	26,8 ± 1,0	29,6 ± 2,5	53,4 ± 3,7	15,5 ± 1,3

Tabla 2.9: Porcentajes de inhibición de la formación de los distintos productos de la oxidación lipídica con respecto a las muestras control.

Al igual que en el caso de las emulsiones, los resultados obtenidos en este experimento evidenciaron la existencia de una dependencia de la actividad antioxidante con el grado de polimerización de las fracciones en músculo de pescado, obteniéndose una mayor eficacia utilizando fracciones con un porcentaje de galoización intermedio. Estos resultados corroboran los sugeridos por Pazos, Gallardo, Torres & Medina (2005) en los que se describe la existencia de una relación óptima en el grado de polimerización medio, situada entre 2 y 3, con la actividad antioxidante de los polifenoles procedentes de bagazo de uva.

5. Evaluación de la influencia de la galoización en la actividad antioxidante en músculo de pescado.

Al igual que la metodología utilizada con las emulsiones, se estudió la relación entre la efectividad antioxidante de fracciones homólogas de pino y uva en músculo de pescado con el objetivo de evaluar la influencia del porcentaje de galoización. En este experimento, comparamos las fracciones OWU y IVU con sus homólogas extraídas de corteza de pino (sin galoización). El experimento se llevó a cabo añadiendo las distintas fracciones en una concentración de 10 ppm sobre músculo de pescado picado y almacenado a 4°C durante cinco días. Las muestras presentaron un porcentaje medio de grasa del $1,3 \pm 0,2$ % y la oxidación fue monitorizada mediante el seguimiento de la formación de peróxidos y malondialdehído.

Todas las fracciones resultaron eficaces inhibiendo la oxidación lipídica pero su actividad fue diferente. Las dos fracciones procedentes de uva mostraron una actividad antioxidante mayor que sus homólogas de pino (Fig. 2.14 y Tabla 2.10) ya que los períodos de inducción fueron mayores. Las muestras con las fracciones de corteza de pino mostraron un incremento significativo en los niveles de peróxidos lipídicos entre los días 1 y 3, mientras que los peróxidos de las muestras con OWU no se incrementaron de manera significativa hasta pasado el tercer día y las muestras con IVU hasta el cuarto. Los porcentajes de inhibición en el quinto día fueron de un 81 % en las muestras con IVU mientras que las restantes no superaron el 79 %. La cinética de formación de aldehídos fue diferente mostrándose, en todos los sistemas, niveles elevados en el tercer día de almacenamiento. Sin embargo, la velocidad de formación fue diferente según el antioxidante, con unas cinéticas similares a las obtenidas mediante la monitorización de la formación de peróxidos. El orden de actividad fue $IVU > OWU > OWP > IVP$ y los porcentajes de inhibición en el tercer día de experimento (tras el período de inducción) fueron del 69 % para las muestras con IVU y menores del 60 % en las muestras con las restantes fracciones (Tabla 2.10). La detección sensorial de la rancidez se produjo tras tres días de almacenamiento en las muestras control y con la fracción IVP. Lo mismo ocurrió, pero de manera menos intensa en las muestras con OWP. Las muestras con fracciones procedentes de uva no mostraron olores asociados a la oxidación lipídica hasta el cuarto día en el caso del músculo con OWU y hasta el quinto en las muestras de músculo con la fracción IVU.

En conclusión, tanto el análisis sensorial como las cinéticas de formación de productos primarios y secundarios (Fig 2.14) mostraron que el número de grupos galato esterificados sobre las procianidinas influye de manera positiva en la actividad antioxidante sobre músculo de pescado. Coincidiendo con los resultados obtenidos por Pazos (2005), la fracción IVU, con una

polimerización y galoización intermedias resultó la más eficaz. Estos resultados confirman los obtenidos en emulsiones de aceite de pescado, donde las fracciones galoizadas también resultaron las más eficaces, confirmando la utilidad de este modelo para predecir el comportamiento en músculo de pescado.

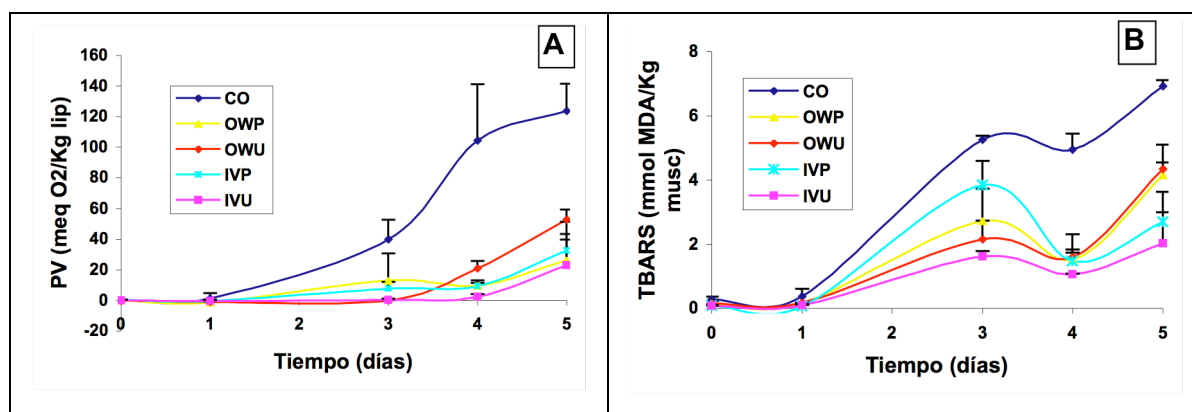


Figura 2.14: Cinética de formación de peróxidos lipídicos (A) y malondialdehído (B) para los distintos sistemas en músculo de pescado refrigerado.

	<i>PV (%)</i>			
Día	OWP	OWU	IVP	IVU
4	90,7 ± 13,5	79,9 ± 5,6	91,0 ± 44,0	97,7 ± 1,2
5	78,8 ± 28,9	57,3 ± 9,5	73,7 ± 26,7	81,5 ± 91,9

	<i>TBARS (%)</i>			
Día	OWP	OWU	IVP	IVU
3	48,2 ± 21,6	59,1 ± 12,8	27,0 ± 13,5	69,4 ± 2,9
5	40,1 ± 3,6	37,3 ± 6,9	61,1 ± 24,5	70,7 ± 29,1

Tabla 2.10: Porcentajes de inhibición en la formación de peróxidos y malondialdehído mostrado por las distintas fracciones con respecto a las muestras control.

6. Evaluación de la eficacia de fracciones procedentes de pino y uva frente a fracciones altamente galoizadas procedentes de corteza de Hamamelis en músculo de pescado.

Una vez comprobada la importancia de la galoización en la actividad antioxidante de las distintas fracciones polifenólicas se estudió la eficacia de las fracciones más eficaces procedentes de pino y uva (IVP y IVU), con un grado de polimerización óptimo y la fracción IVH procedente de Hamamelis, con el objeto de estudiar la influencia de una elevada concentración de grupos galato. Para ello se adicionaron las distintas fracciones sobre músculo picado de jurel almacenado durante 18 días a 4 °C. El músculo presentó un porcentaje medio de grasa, de $1,3 \pm 0,2$ %. El experimento se llevó a cabo con 4 sistemas: un control sin antioxidantes y las 3 fracciones en una concentración de 100 ppm (p/p). La oxidación lipídica fue monitorizada mediante la formación de peróxidos (PV), aldehídos (TBARS) y la cinética de formación de volátiles. La formación de hidroperóxidos lipídicos en las muestras sin aditivos (control) comenzó a partir del 5º día de experimento (Fig. 2.15), mientras que los sistemas con las fracciones se oxidaron en el orden IVP (tras 12 días), IVU (tras 12 días) y IVH (tras 14 días). Las muestras con IVP no mostraron un incremento significativo en la formación de malondialdehído hasta el décimo día, mientras que no se observó un período de inducción claro en las muestras con IVU y IVH a lo largo del experimento. La medida de 1-penten-3-ol mostró las mayores diferencias en la efectividad antioxidante de las distintas fracciones. La IVP resultó la menos activa, observándose una clara diferencia entre las muestras suplementadas con esta fracción y los demás sistemas con antioxidantes (Fig. 2.16). La fracción IVH resultó ligeramente más eficaz que la IVU inhibiendo la formación del 1-penten-3-ol. Ambos sistemas mostraron un período de inducción de aproximadamente 14 días pero la IVH fue más efectiva ya que disminuyó significativamente la velocidad de formación del volátil con respecto a las muestras con IVU (Fig. 2.16). Los porcentajes de inhibición de la formación de 1-penten-3-ol, tras 16 días almacenamiento, fueron 23 %, 70 % y 88 % respectivamente para IVP, IVU y IVH (Tabla 2.12).

El análisis sensorial fue coherente con los resultados obtenidos en los índices químicos de seguimiento del deterioro oxidativo. El control desarrolló un incipiente olor a rancio tras 10 días de almacenamiento mientras que las muestras suplementadas con la fracción IVP mostraron un olor rancio a los 12 días de almacenamiento. El músculo tratado con las fracciones de uva y Hamamelis no mostró olores asociados a la rancidez durante todo el experimento.

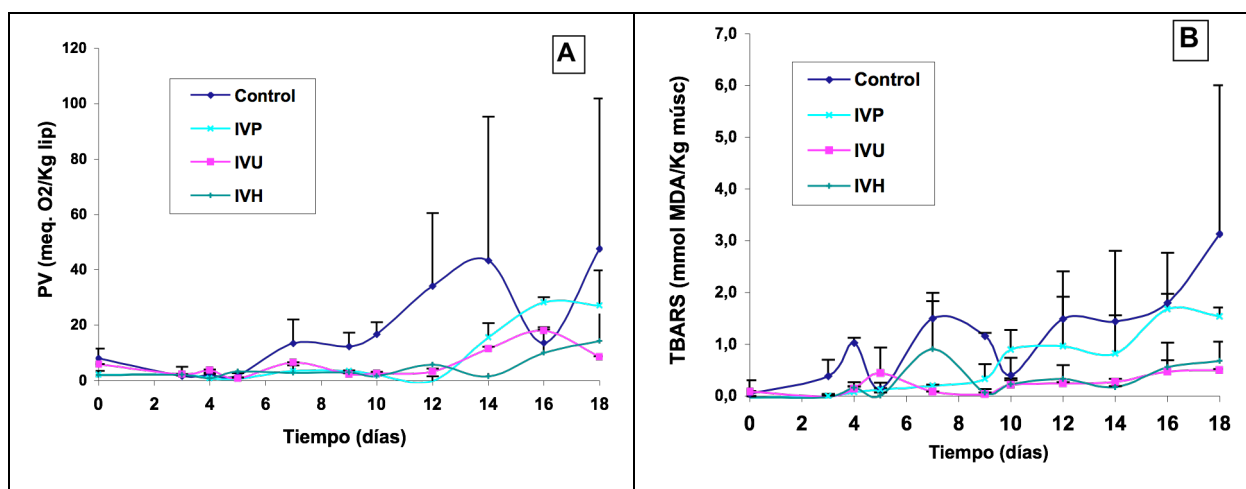


Figura 2.15: Cinética de formación de hidroperóxidos (A) y malondialdehído (B) en músculo de jurel refrigerado con diferentes antioxidantes.

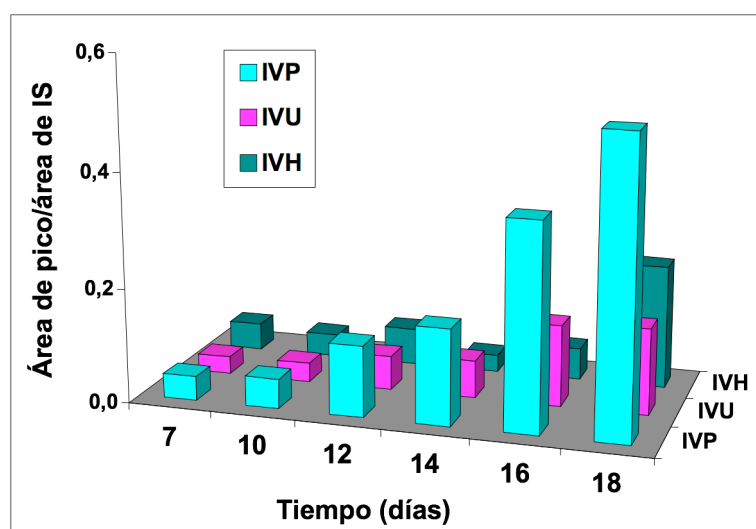


Figura 2.16: Cinética de formación de 1-penten-3-ol en músculo de jurel refrigerado con fracciones purificadas procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis.

Los resultados indican una mejora de la eficacia al aumentar el número de grupos galato, mostrando el siguiente orden de actividad antioxidante: IVH > IVU > IVP.

Día	<i>PV (%)</i>			<i>TBARS (%)</i>		
	IVP	IVU	IVH	IVP	IVU	IVH
12	100,4 ± 88,5	90,3 ± 52,4	83,1 ± 9,1	35,4 ± 35,0	83,7 ± 6,7	77,8 ± 62,8
14	64,2 ± 21,1	73,7 ± 31,4	96,7 ± 75,4	42,7 ± 37,9	80,7 ± 16,6	88,1 ± 7,8
18	43,2 ± 20,1	82,1 ± 17,3	70,1 ± 48,7	50,8 ± 5,4	84,1 ± 2,7	78,4 ± 43,2

Tabla 2.11: Porcentajes de inhibición de la formación de peróxidos y malondialdehído con respecto a las muestras control.

Día	<i>1-Penten-3-ol (%)</i>		
	IVP	IVU	IVH
10	61,7 ± 82,4	75,5 ± 11,4	70,2 ± 28,9
12	74,4 ± 27,0	87,8 ± 27,5	86,9 ± 47,8
14	60,8 ± 48,5	84,6 ± 14,7	93,1 ± 12,6
16	23,1 ± 10,3	69,7 ± 19,7	88,1 ± 41,8

Tabla 2.12: Porcentajes de inhibición de la formación 1-penten-3-ol con respecto a las muestras control.

2.1.4. Discusión

2.1.4.1. Efectividad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos.

Los experimentos descritos en esta memoria evidenciaron las diferencias entre las actividades antioxidantes de los ácidos hidroxicinámicos en músculo de pescado, tanto durante el almacenamiento en congelado como en refrigerado, cuya eficacia fue en el orden clorogénico y o-cumárico < ferúlico < cafeico. Como se ha mencionado anteriormente, la poca eficacia del ácido clorogénico podría deberse a su elevado valor de peso molecular provocando que su concentración molar sobre el sustrato lipídico sea menor con respecto a los restantes ácidos hidroxicinámicos, reduciendo de esta manera su eficacia relativa. Tanto en el experimento sobre músculo refrigerado como en congelado, la actividad estuvo directamente relacionada con la capacidad reductora confirmando los estudios realizado por Natella, Nardini, Di Felice & Scaccini (1999) sobre la actividad antioxidante de distintos ácidos fenólicos en la oxidación de LDL. La capacidad reductora del ácido o-cumárico (Tabla 2.1) deriva del hidroxilo en posición *para*, permitiendo la deslocalización a lo largo de toda la molécula del electrón desapareado, tras la formación del radical fenoxilo. La presencia del grupo dador -OCH₃ en el ácido ferúlico, en *orto* a este hidroxilo, aumenta la estabilidad del radical, incrementando la capacidad de cesión electrónica (Chen & Ho, 1997). El Caf-OH presenta la mayor capacidad reductora (Tabla 2.1) debido a la presencia del grupo -OH en *orto* al primer hidroxilo. Esta disposición aumenta su actividad con respecto al ácido o-cumárico, debido a la deslocalización adicional sobre ese segundo hidroxilo y al establecimiento de puentes de hidrógeno intramoleculares entre ambos grupos. La suma de ambos factores incrementa la estabilidad del radical hidroxifenoxil (Cheng, Dai, Zhou, Yang & Liu, 2007). La esterificación con ácido químico para dar lugar al ácido clorogénico reduce notablemente la capacidad de donación de electrones, a pesar del incremento del número de hidroxilos en relación al Caf-OH.

La capacidad quelatante se relaciona con la efectividad de una sustancia en la inhibición de la actividad catalizadora de metales como el Fe²⁺ o el Cu⁺, lo que se traduce en un retardo en la aparición del deterioro oxidativo. La capacidad quelatante está directamente relacionada con el número de grupos hidroxilo de la molécula (Medina, Gallardo, González, Lois & Hedges, 2007), siendo esta diferencia estructural el factor determinante entre el Caf-OH y su derivado el ácido clorogénico, y los ácidos cumárico y ferúlico. Los ácidos cafeico y clorogénico presentan dos

grupos hidroxilo en *orto* mientras que los ácidos o-cumárico y ferúlico tan solo poseen uno a lo largo del anillo fenólico y como consecuencia una nula capacidad para neutralizar la actividad catalítica de los diferentes metales. Por tanto, la capacidad quelatante de los ácidos hidroxicinámicos no se correlacionó directamente con la actividad. Las grandes diferencias mostradas entre la eficacia de los ácidos o-cumárico y ferúlico en músculo congelado no se correlacionaron con sus respectivas capacidades quelatantes (Tabla 2.1) mientras que los ácidos ferúlico y cafeico mostraron una actividad antioxidante muy similar durante el almacenamiento a 4 °C, a pesar de las grandes diferencias en relación a esta propiedad (Tabla 2.1).

La polaridad de un antioxidante influye significativamente en la efectividad ya que determina la difusión y localización del aditivo en los lugares activos de la oxidación. El carácter hidrofílico de los compuestos fenólicos, facilita su localización en las interfases de las membranas lipídicas, incrementando su actividad (Laranjinha & Cadenas, 1999). Esta localización les permite neutralizar radicales libres presentes en la fase acuosa, a la vez que pueden interactuar de forma sinérgica con el sistema antioxidante endógeno, tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica (Laranjinha & Cadenas, 1999). La mayor actividad antioxidante del Caf-OH se correspondió con su menor coeficiente de partición (mayor carácter hidrofílico) (Tabla 2.1). Las diferencias encontradas en la efectividad de los ácidos clorogénico y ferúlico durante el almacenamiento en refrigerado y entre o-cumárico y ferúlico en congelado, no se correspondieron con sus coeficientes de partición. El orden de actividad antioxidante en músculo de pescado fue cafeico > ferúlico > clorogénico o cumárico a pesar de que el cafeico fue el más hidrofílico seguido por el clorogénico, el o-cumárico y por último el ferúlico.

La temperatura de almacenamiento del músculo no influyó en el orden relativo de efectividad. Sin embargo, el ácido ferúlico mostró una actividad muy similar a la del Caf-OH durante el almacenamiento del músculo refrigerado mientras que en congelado, la actividad relativa fue menor, mostrando una efectividad muy similar a la del o-cumárico. En el experimento de almacenamiento en refrigerado, tras 6 días de almacenamiento y durante la etapa de propagación en las muestras control (valor de TBARS de aproximadamente 3,5 mmol MDA/Kg de músculo), los sistemas con Caf-OH y ferúlico mostraron unos porcentajes de inhibición próximos al 100 %. En el experimento en congelado, tras el primer mes, las muestras control mostraron un índice TBARS de aproximadamente 3,8 mmol MDA/Kg de músculo y, mientras que el Caf-OH inhibió la formación de aldehídos en un 85 % el ácido ferúlico solamente inhibió el 37 % con respecto a los controles. Estos resultados evidenciaron una ligera dependencia entre la actividad antioxidante y la temperatura de almacenamiento del músculo. La

razón de esta dependencia podría residir en la reducción de la velocidad de difusión de los antioxidantes en su camino hasta los lugares donde ejercen su actividad al disminuir la temperatura (Medina, González, Iglesias & Hedges, 2009), siendo este factor más acusado en los antioxidantes más lipofílicos o con mayores coeficientes de partición aceite/agua.

En conclusión, todos los ácidos hidroxicinámicos retardaron la aparición de los productos de la oxidación lipídica en músculo de pescado y esta efectividad estuvo directamente relacionada con su capacidad reductora. El Caf-OH fue el más activo debido a su mayor capacidad reductora, quelatante y su mayor carácter hidrofílico, derivados de su estructura química. La temperatura de almacenamiento resultó una variable con influencia en la eficacia de los distintos antioxidantes, disminuyendo al pasar de un almacenamiento refrigerado a congelado. La reducción de la velocidad de difusión podría ser la causa de esta observación observándose un efecto más acusado en antioxidantes más lipofílicos.

2.1.4.2. Influencia del grado de polimerización y el porcentaje de galoización en la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas.

Los estudios detallados en este capítulo suponen la continuación de trabajos previos llevados a cabo en nuestro grupo en los que se sugirió la existencia de una relación entre características estructurales de las procianidinas, como el grado de polimerización y el porcentaje de galoización, y su actividad antioxidante en productos derivados de la pesca (Pazos, 2005). En el presente estudio se comprobó que todas las fracciones polifenólicas empleadas, procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis, resultaron efectivas retardando la oxidación tanto en emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado. Las fracciones de pino constituyen un modelo ideal para estudiar la influencia del grado de polimerización en la actividad antioxidante debido a que no poseen grupos galato en su estructura molecular, eliminando de esta forma una de las variables responsables de la actividad de los procianidinas. Los resultados obtenidos tanto en emulsiones como en músculo demostraron que el grado de polimerización es una variable importante en la actividad antioxidante de las distintas fracciones polifenólicas. La comparación de las actividades de las fracciones IXP, XP y XIP, con grados de polimerización de 1,9, 2,2, y 3,4 respectivamente, evidenciaron la existencia de un óptimo de polimerización situado entre 2 y 3, confirmando los resultados sugeridos por Pazos (2005), tras el estudio sobre una batería de fracciones procedentes de bagazo de uva. Las propiedades químicas derivadas del aumento del grado de polimerización radican fundamentalmente en el aumento de

la capacidad reductora, quelatante y del carácter lipofílico. Por tanto, el orden de eficacia no se correlacionó directamente con ninguna de estas tres variables. Se ha sugerido que el aumento del impedimento estérico a medida que se incorporan nuevas unidades al oligómero, a partir del óptimo, podría ser la causa de la disminución de la actividad en las procianidinas con un mayor grado de polimerización (Pazos, 2005).

En trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo (Pazos, 2005, Pazos, Gallardo, Torres & Medina, 2005), se seleccionaron la OWU y la IVU, entre una batería de fracciones extraídas de bagazo de uva, como las fracciones más eficaces inhibiendo la oxidación lipídica en productos derivados de la pesca. Por esta razón, ambas fracciones fueron elegidas para evaluar la influencia del porcentaje de galoización en la actividad antioxidante mediante la comparación de su actividad con la de sus homólogas procedentes de corteza de pino (sin galoización). Todas las fracciones ensayadas (OWP, OWU, IVP y IVU) resultaron eficaces inhibiendo la oxidación, tanto en emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado. Los resultados obtenidos en emulsiones evidenciaron la influencia de la galoización en la actividad antioxidante de las procianidinas. Un mayor porcentaje de galoización aporta a la procianidina una mayor cantidad de grupos pirogalol (tres hidroxilos en posiciones consecutivas a lo largo de un anillo bencénico) que incrementan la capacidad quelatante, antiradicalaria y reductora además del carácter lipofílico. De la misma forma, las fracciones procedentes de bagazo de uva fueron más eficaces que las de corteza de pino en músculo de pescado. Sin embargo las diferencias de actividad entre ambos grupos de procianidinas no fueron tan evidentes. Incluso la OWP mostró un mayor porcentaje de inhibición que su homóloga de uva en la formación de malondialdehído (40 % y 37 % respectivamente) en el último día de experimento. La explicación de este fenómeno podría radicar en la aumento del carácter lipofílico en las fracciones galoizadas. En emulsiones, los antioxidantes más lipofílicos presentan una mayor actividad debido a que se sitúan en las interfases aceite/agua, donde son más eficaces inhibiendo el deterioro oxidativo (paradoja polar (Frankel, 1998)). En el caso del músculo de pescado, el mayor carácter hidrofílico de las fracciones procedentes de pino aumenta su eficacia antioxidante al mismo tiempo que disminuye la actividad en las fracciones de uva con respecto a su comportamiento en emulsiones.

A pesar de que el proceso de obtención de las fracciones procedentes de los distintos residuos fue similar, la composición de las fracciones de corteza de Hamamelis fue muy distinta en relación a sus fracciones homologas de pino y uva. A diferencia de las fracciones IVP y IVU, la fracción IVH presentó una composición muy reducida en oligómeros de catequinas y un alto porcentaje de taninos hidrolizables (ésteres de ácido gálico glicosilados) (Medina, Torres, &

González, 2009). El alto porcentaje de galoización convirtió a la fracción IVH en una buena alternativa a las fracciones IVP y IVU ya que tanto en emulsiones como en músculo de pescado, mostró una actividad similar a la IVP, siendo incluso la más efectiva en músculo de pescado. Su alto porcentaje de galoización (70 %), incrementó sus capacidades antiradicalaria, reductora y quelatante con respecto a las fracciones de pino y uva derivando en un aumento de la eficacia antioxidante.

La valoración de la utilización de un aditivo debe incluir, además de su actividad antioxidante, otras variables relacionadas con el carácter funcional, la toxicidad o el encarecimiento del precio del alimento. Las fracciones procedentes de bagazo de uva y Hamamelis fueron las que mostraron una mayor actividad antioxidante relacionada con la presencia de galatos en su composición química. La utilización de las fracciones de pino, a pesar de ser las menos eficaces, son una buena alternativa debido al menor coste que conlleva su obtención, por lo que su adición encarecería mínimamente el precio del alimento. La búsqueda de combinaciones entre fracciones de pino, uva y Hamamelis con el fin de lograr un producto económico con un grado de polimerización y un porcentaje de galoización adecuados, podría ser una solución de compromiso con el fin de aumentar la efectividad antioxidante y reducir los costes de obtención de los extractos. Además, se ha sugerido que las catequinas galoizadas podrían intervenir en el ciclo celular o en procesos de replicación y apoptosis (Liang, Lin-shiau, Chen & Lin, 1997, Liberto & Cobrinik, 2000) por lo que podría cuestionarse la utilización de aditivos altamente galoizados.

Por último, la aplicación de las distintas fracciones utilizadas en este capítulo, no alteró atributos organolépticos del músculo como el color o el aroma, siendo éste un aspecto muy importante en cuanto a la aceptación del alimento por parte del consumidor tras la adición de los distintos antioxidantes.

2.1.5. Conclusiones

- 1) Todos los antioxidantes ensayados, incluyendo los ácidos hidroxicinámicos y las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis, resultaron eficaces inhibiendo la oxidación lipídica independientemente del sustrato sobre el que se aplicaron (emulsiones de aceite de pescado y músculo de pescado).
- 2) Entre los ácidos hidroxicinámicos ensayados, el Caf-OH fue el más eficaz inhibiendo la oxidación lipídica tanto músculo refrigerado como en congelado. El orden de actividad estuvo directamente relacionado con la capacidad reductora (cafeico > ferúlico > clorogénico u o-cumárico). El Caf-OH presentó además la mayor capacidad quelatante, por lo que resultó el más eficaz neutralizando metales catalizadores del proceso oxidativo; y un mayor carácter hidrofílico, facilitando la difusión hacia los lugares activos de la oxidación y las interacciones con el sistema antioxidante endógeno.
- 3) Del estudio de la actividad de las procianidinas procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis se extrajeron las siguientes conclusiones:
 - Los experimentos con procianidinas procedentes de corteza de pino demostraron la dependencia de la actividad antioxidante con el grado de polimerización, tanto en emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado. Los resultados mostraron que las fracciones con un grado de polimerización intermedio, entre 2 y 3, fueron las más eficaces debido, probablemente, a que el aumento del número de monómeros incrementa el impedimento estérico en las procianidinas de mayor tamaño, impidiendo que todos los grupos hidroxilo sean igualmente activos.
 - La comparación entre fracciones de procianidinas procedentes de corteza de pino y bagazo de uva demostró la importancia de la galoización en la actividad antioxidante ya que los grupos galato esterificados de la procianidina aportan una mayor cantidad de grupos pirogalol a la molécula, incrementando sus capacidades antiradicalaria, quelatante y reductora, y por lo tanto la eficacia antioxidante.

- El alto porcentaje de grupos galato en la estructura de la fracción IVH la convierte en una buena alternativa para su utilización como aditivo antioxidante ya que, junto con la fracción IVU, fue la más eficaz inhibiendo el proceso oxidativo. Sin embargo, su precio puede limitar su uso como aditivo, convirtiendo a la fracción procedente de bagazo de uva en la más adecuada para su utilización en productos derivados de la pesca, ya que no mostraron grandes diferencias en eficacia.

2.2. INTERACCIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES CON EL SISTEMA ENDÓGENO PROOXIDANTE/ANTIOXIDANTE DEL MÚSCULO DE PESCADO.

2.2.1. Introducción

Existen numerosos estudios en la bibliografía acerca de los mecanismos de actividad de una gran variedad de antioxidantes basados en sus características físico-químicas. Sin embargo, hasta el momento el conocimiento de las interacciones de esos antioxidantes con los componentes de la matriz sobre la que se aplican es muy limitado. Para poder conocer el mecanismo por el que un aditivo actúa como antioxidante en un sistema complejo como el músculo de pescado es necesario conocer sus interacciones con los distintos componentes del tejido sobre el que se aplican.

Tanto los ácidos hidroxicinámicos como las fracciones polifenólicas procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis han demostrado ser eficaces retardando la oxidación lipídica en alimentos derivados de la pesca. En la primera parte de este capítulo se ha tratado de relacionar la actividad antioxidante con la estructura y propiedades físico-químicas de los antioxidantes. Sin embargo, en un sistema complejo como el músculo de pescado es imprescindible el conocimiento de las interacciones entre los aditivos antioxidantes y los componentes de la matriz sobre la que se van a aplicar para entender los mecanismos de funcionamiento de dicho antioxidante exógeno. Entre estos mecanismos, destacan la protección y/o regeneración de las sustancias que conforman el sistema antioxidante endógeno o la inactivación de metales y otras sustancias prooxidantes.

El sistema antioxidante endógeno del músculo está formado por una serie de componentes que, tras la muerte del pescado, son consumidos de manera secuencial debido a la protección que siguen ejerciendo sobre el deterioro oxidativo y al cese de la actividad de los sistemas de regeneración. Entre estos componentes, el α -TOH es el principal y más importante ya que diversos trabajos sugieren que es la última barrera de protección contra la oxidación y se ha comprobado que su consumo deriva en el comienzo del deterioro oxidativo (Pazos, González, Gallardo, Torres & Medina, 2005, Pazos, Sánchez & Medina, 2005). El AA es otro de los componentes de este sistema y además de su capacidad antiradicalaria, reductora y quelatante, su

principal mecanismo antioxidante es la regeneración del α -TOH endógeno como ya ha sido documentado en diversas publicaciones (Frankel, 1998, Niki, Tsuchiya, Tanimura & Kamiya, 1982). Varios estudios han mostrado que tanto los ácidos hidroxicinámicos como algunos tipos de procianidinas, interactúan con el sistema antioxidante del músculo, reforzándolo y aumentando la resistencia a los procesos de deterioro oxidativo. Así, se ha comprobado la existencia de interacciones entre distintos ácidos hidroxicinámicos y el α -TOH o el AA en LDL (Cheng, Dai, Zhou, Yang & Liu, 2007, Laranjinha, Vieira, Madeira & Almeida, 1995, Laranjinha & Cadenas, 1999, Laranjinha, 2001) o micelas Triton X-100 (Ohara, Ichimura, Tsukamoto, Ogata, Nagaoka & Mukai, 2006). De la misma forma, ha sido sugerida la regeneración del α -TOH mediante la acción de procianidinas o catequinas en LDL (Lourenço, Gago, Barbosa, De Freitas & Laranjinha, 2008), micelas (Zhou, Wu, Yang & Liu, 2005), disoluciones homogéneas (Pazos, Andersen, Medina & Skibsted, 2007) o músculo de pescado (Pazos, 2005, Pazos, González, Gallardo, Torres & Medina, 2005, Pazos, Sánchez & Medina, 2005).

Entre las sustancias que intervienen en el balance antioxidante/prooxidante del músculo, la Hb ha sido identificada como uno de los mas potentes prooxidantes endógenos pudiendo desencadenar el proceso oxidativo mediante diversos mecanismos (Frankel, 1998). Entre éstos destaca el hecho de que puede ser una fuente de oxígeno activado tras su autooxidación o también la posibilidad de liberar el hierro contenido en el grupo hemo y actuar como catalizador del proceso oxidativo (Richards & Hultin, 2002). Diversos factores afectan a este proceso, entre los que destacan la concentración, el tipo de Hb, el pH, el volumen de plasma y la integridad de los eritrocitos (Pazos, Lois, Torres & Medina, 2006). El efecto de algunos antioxidantes naturales sobre la actividad prooxidante de la Hb en pescado ha sido estudiada en varias publicaciones (Lee, Krueger, Reed & Richards, 2006, Pazos, 2005, Pazos, Lois, Torres & Medina, 2006).

En el capítulo anterior se trató de relacionar la eficacia de dos grupos de sustancias antioxidantes (ácidos hidroxicinámicos y fracciones polifenólicas procedentes de residuos naturales) con sus características físico-químicas y estructurales. Con el objeto de profundizar en los mecanismos que rigen esa actividad, en este capítulo se abordó el estudio de las interacciones de estos aditivos con algunos de los componentes del sistema antioxidante (α -TOH y AA) y prooxidante (Hb) endógeno del músculo de pescado.

En primer lugar, se estudiaron las interacciones de los antioxidantes Caf-OH y fracción IVU, con los componentes del sistema endógeno, α -TOH y AA de músculo de pescado. Para ello, se siguió la evolución de los componentes del sistema endógeno en varios sistemas de

músculo picado almacenado a 4 °C, a los que se les adicionaron los aditivos ensayados en diferentes concentraciones.

A continuación se llevó a cabo el estudio del efecto de las fracciones purificadas procedentes de pino, uva y Hamamelis sobre la actividad prooxidante de la Hb. En una primera fase, realizada en sistemas modelo in vitro, se estudió la influencia de distintos factores que afectan a la actividad prooxidante de la Hb, y sus interacciones con las fracciones polifenólicas. Se ensayó el efecto del tipo de Hb, se llevó a cabo el estudio de la dependencia de la velocidad de autooxidación de la hemoproteína con el pH, debido a la importancia de este parámetro por las variaciones que sufre durante el almacenamiento de músculo post-mortem y, finalmente, con objeto de clarificar los mecanismos que rigen la actividad de las procianidinas se observó el comportamiento de distintas fracciones polifenólicas sobre la formación de metHb. En una segunda fase, se utilizó músculo lavado de jurel como sistema modelo para estudiar la actividad de las fracciones polifenólicas en la inhibición de la oxidación lipídica promovida por la Hb. Se eligió este sistema modelo ya que además de su simplicidad, conserva la estructura del músculo (proteínas y lípidos) y un contenido muy reducido de antioxidantes y prooxidantes hidrofílicos (Larsson, Almgren & Undeland, 2007), permitiendo la adición la hemoproteína de manera controlada.

2.2.1. Experimental

2.2.1.1. Material

1. *Pescado*

Para llevar a cabo los experimentos sobre músculo y músculo lavado se utilizó jurel (*Trachurus trachurus*). Las Hb a ensayar se extrajeron de jurel, pescadilla (*Merluccius merluccius*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*). Todos los individuos fueron adquiridos en un mercado local de Vigo y presentaron una calidad extra de frescura (DOCE, 1989).

2. *Antioxidantes*

El Caf-OH fue adquirido a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los extractos fenólicos de corteza de pino (OWP y IVP), bagazo de uva (OWU, IVU) y corteza de Hamamelis (IVH) fueron extraídos y cedidos por el Dr. Josep Lluís Torres del IIQAB de Barcelona (CSIC), de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.1.2.2.2 del Capítulo 2.

3. *Reactivos*

Los reactivos empleados fueron de grado analítico. La Hb bovina, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), heparina sódica, dodecil sulfato sódico (SDS), tris[hidroximetil]aminometano (Tris), ditionato sódico, sulfato de estreptomicina, L-histidina, ácido ascórbico (AA), α -tocoferol (α -TOH), ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico, 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), tiocianato amónico, cloruro ferroso tetrahidratado y el cloruro férrico hexahidratado fueron adquiridas a Sigma (St. Louis, MO, USA). El monóxido de carbono se obtuvo de Matheson Gas (Gloucester, MA, USA) y de Air Liquide (Porriño, Galicia). El agua empleada fue de calidad Milli-Q y los disolventes de grado analítico.

2.2.1.2. Métodos

1. Estudio de las interacciones entre antioxidantes naturales y el sistema antioxidante endógeno del músculo. El α -TOH y el AA.

La preparación de los experimentos en músculo de pescado se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.1.2.4.1. de este capítulo. Tanto en los experimentos con los sistemas con Caf-OH como en los de fracción IVU, se estudiaron 5 sistemas con diferentes concentraciones de antioxidante: 0 ppm (control), 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm. La oxidación lipídica de todos los sistemas se siguió mediante el análisis de PV, TBARS y el análisis sensorial, a la vez que se monitorizó la evolución del consumo de los antioxidantes endógenos α -TOH y AA.

a) Determinación de peróxidos lipídicos. Índice de peróxidos (PV).

Para la determinación del índice de peróxidos se siguió el método propuesto por Chapman & Mackay (1949) empleando el extracto lipídico de la extracción Bligh & Dyer según la metodología descrita en el apartado 1.3.2.11 del Capítulo 1.

b) Determinación de malondialdehído. Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Este análisis se llevó a cabo de acuerdo con el método de Vyncke (1970) para la determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBA) siguiendo la metodología descrita en el apartado 1.3.1.12 del Capítulo 1.

c) Determinación del α -TOH

Se determinó la concentración de α -TOH en músculo de pescado mediante adaptación del método de extracción descrito por Burton, Webb & Ingold (1985). La determinación analítica se realizó mediante HPLC en fase reversa, con detección espectrofotométrica (Cabrini, Landi, Stefanelli, Barzanti & Sechi, 1992). Se homogenizó 1 g de músculo en 3 mL de una disolución refrigerada de fosfato sódico 5 mM, a pH 8,0, con un homogenizador Ultra-Turrax. A continuación se añadieron 4 mL de 0,1 M de docecil sulfato sódico (SDS) y las muestras se agitaron intensamente durante 1 min, con vortex. Se incorporaron

8 mL de etanol absoluto y se agitaron durante 1 min. Se añadieron 2 mL de hexano y las muestras se mezclaron de nuevo durante 1 min. Las fases se separaron mediante centrifugación a 2000 *g* durante 10 min, y se recuperó la fase superior de hexano. La fase acuosa se lavó posteriormente con 1 mL de hexano. La fase de hexano se llevó a sequedad con una corriente de nitrógeno y el α -TOH se extrajo dos veces con 1 mL de metanol. El metanol se evaporó con una corriente de nitrógeno y se añadieron 0,3 mL de etanol absoluto.

El análisis del α -TOH se realizó en un equipo de HPLC, equipado con un bucle de inyección de 20 μ L, un sistema de bombas peristálticas Beckman System Gold Módulo 126 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA, USA) y un detector array de diodos (DAD) Beckman System Gold Módulo 168, según las condiciones descritas en la Tabla 2.13.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Tipo de columna	Waters Spherisorb (C18) de 250 x 4,6 mm de D.I., con un tamaño de partícula de 5 μ m
Flujo	1 mL/min
Elución	Gradiente: de 0 a 60 % de B entre 0 y 9 min, y mantenimiento del 60 % de isopropanol de 9 a 19 min
Fase móvil	Sistema binario MeOH (A):Isopropanol (B)
Detección	UV (292 nm)

Tabla 2.13: Condiciones cromatográficas para la determinación de α -TOH mediante HPLC con detector DAD.

El α -TOH se identificó por comparación de su tiempo de retención y de su espectro de absorción con los de un patrón comercial. La cuantificación se llevó a cabo a 292 nm (correspondiente con el máximo del espectro de absorción), a partir de curvas de calibrado, y las concentraciones se expresaron en μ g/g lípido.

d) Determinación del AA

Para la determinación de AA se siguió la metodología optimizada y validada descrita en el Capítulo 1.1. de esta memoria. Brevemente, el AA y el DHAA se extrajeron de 3 g de músculo picado con 8 mL de ácido metafosfórico al 4,5 % con ayuda de un Ultra Turrax. Tras la separación de las fases mediante centrifugación dos alícuotas del extracto (3 mL) fueron retiradas

para la determinación de AA y DHAA respectivamente. El AA fue oxidado a DHAA con I₂ y se derivatizó con DMPD, protegida de la luz y a temperatura ambiente. El DHAA derivatizado se extrajo de la disolución acuosa con 1 mL de isobutanol. Para la determinación de DHAA se siguió el mismo procedimiento sin la etapa de oxidación.

La determinación se llevó a cabo mediante HPLC con detector de fluorescencia. La concentración de AA se obtuvo por diferencia entre la concentración de ácido ascórbico total (AA+DHAA) de la primera alícuota y la de DHAA de la segunda y se expresó en µg/g músculo.

e) Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo por un panel formado por 3-4 profesionales entrenados, siguiendo el baremo indicado en la correspondiente directiva europea (DOCE, 1989), según la metodología detallada en el apartado 1.3.2.10 del Capítulo 1.

2. Estudio de las interacciones entre antioxidantes naturales y el sistema prooxidante endógeno del músculo. La hemoglobina.

a) Obtención de la Hb

La Hb se obtuvo de la sangre sustraída a ejemplares frescos de jurel, pescadilla y lubina. El hemolizado se preparó con las modificaciones indicadas por Richards & Hultin (2000), del método original de Fyhn, Fyhn & Davis (1979).

La sangre se tomó por la vena caudal que atraviesa el esqueleto, tras cortar la cola, con una pipeta pasteur de vidrio, previamente empapada con una disolución acuosa de heparina sódica de 30 unidades/mL y 150 mM de cloruro sódico. La sangre extraída se mezcló inmediatamente con 1 volumen de la disolución salina de heparina sódica. Sobre la sangre con heparina, se añadieron 4 volúmenes de una disolución de cloruro sódico al 1,7 %, preparada en Tris 1 mM, pH 8,0. La suspensión resultante se centrifugó a 700 g y 4 °C, durante 10 min, en una ultracentrífuga (Beckman Avanti J-25; Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La centrifugación permitió la separación del plasma y los glóbulos rojos, que precipitaron. Después de eliminar el plasma (disolución sobrenadante) los glóbulos rojos se lavaron 3 veces por resuspensión en 10 volúmenes de la disolución de cloruro sódico al 1,7 % y posterior centrifugación a 700 g. La rotura de las membranas de los glóbulos rojos, para la liberación de la Hb, se realizó mediante la incubación con 3 volúmenes de una disolución 1 mM de Tris, pH 8,0, en hielo, durante 1 h.

Después se añadieron 0,1 volúmenes de una disolución acuosa de NaCl 1 M, para favorecer la eliminación de las membranas celulares de los glóbulos rojos, o estroma. La centrifugación, a 28000 g, 4 °C durante 15 min, permitió la separación de la Hb y del estroma, que precipitó. La Hb se almacenó a -80 °C hasta su utilización, descongelándose justo antes de su empleo.

b) Cuantificación de la Hb en el hemolizado

Los niveles de Hb en el hemolizado, se determinaron con el método de Brown (1961) basado en la medida espectrofotométrica del derivado de la Hb con el monóxido de carbono, en la región de 380-440 nm, o región Soret.

El hemolizado se diluyó entre 100-150 veces en una disolución 50 mM de Tris, pH 8,6. En el hemolizado diluido (3 mL), se adicionó aproximadamente 1 mg de ditionato sódico, agitando con una espátula hasta su perfecta disolución. A continuación se burbujeó con monóxido de carbono gas durante 20 s y se midió la absorbancia de la muestra en la región Soret del espectro, en un espectrofotómetro de un solo haz Beckman DU 640 (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, CA). El blanco se realizó con la disolución de Tris 50 mM. Se empleó la diferencia de absorbancia entre el valor máximo y el mínimo del pico Soret, para cuantificar el contenido de Hb. La recta de calibrado se construyó usando Hb bovina como patrón.

c) Cuantificación de Hb en músculo de pescado.

Se cuantificó la Hb contenida en músculo de jurel con el objeto de calcular la relación entre la concentración de hemoproteína y la de antioxidante añadido y utilizarla posteriormente en los estudios *in vitro*. Para ello, 2 g de músculo de jurel fueron homogeneizados con 25 mL de disolución tampón (50 mM de Tris + 1 mM AEDT + 80 mM de KCl ajustada a pH 8 con HCl 0,5 M) durante 1 minuto con ayuda de un Turrax. Ambas fases fueron separadas mediante centrifugación durante 40 minutos a 37.000 g y 4 °C. Tras filtrar el extracto, la Hb se cuantificó de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. La concentración final en el músculo de jurel fue de $27,3 \pm 3,6 \mu\text{mol/Kg}$ de músculo.

d) Medida de la autooxidación de la Hb.

La oxidación espontánea de la Hb se determinó mediante el análisis de los cambios espectrales originados durante su incubación tras la formación de metHb (Kristinsson & Hultin, 2004, Winterbourn, 1990). La concentración de metHb se obtuvo mediante la ecuación propuesta por Winterbourn (1990), para el análisis de mezclas binarias de oxiHb y metHb. Esta ecuación determina la concentración molar de metHb basándose en los coeficientes de extinción molar y en la elevada absorción de la metHb a 630 nm:

$$[\text{metHb}] = (279 A_{630} - 3,0 A_{576})/4$$

donde A₆₃₀ y A₅₇₆ representan la absorbancia de la mezcla a 630 y 576 nm. La concentración de metHb viene expresada en μM . La reducción de la absorbancia del pico de 576 nm con el tiempo, también se empleó para estimar la autooxidación de la hemoproteína (Undeland, Kristinsson & Hultin, 2004). La medida se obtuvo restando la absorbancia en el máximo, observado a 576 nm para la Hb, y la absorbancia en el valle del pico a 560 nm.

Para el estudio del efecto del pH sobre la velocidad de autooxidación, se utilizaron varias disoluciones de Hb de jurel 10 μM en 0,12 M de cloruro potásico y 5 mM de L-histidina a distintos pHs entre 6 y 8,25 unidades. Las disoluciones se almacenaron a 4 °C y se siguió la evolución mediante la adquisición de los espectros de absorción en un rango longitudes de onda de 360 a 640 nm a distintos tiempos. El blanco contenía solamente la disolución tampón.

El estudio del efecto de los compuestos fenólicos sobre la autooxidación, se realizó utilizando disoluciones de Hb de jurel 10 μM en 0,12 M de KCl y 5 mM de L-histidina, a pH 6,8. Las distintas fracciones se añadieron tratando de preservar la relación concentración de Hb/concentración de antioxidante considerando una adición de 50 ppm sobre músculo de jurel, concentración que se ha comprobado que resulta efectiva inhibiendo la oxidación lipídica. Dado que la concentración de Hb en músculo de jurel resultó ser de $27,3 \pm 3,6 \mu\text{mol/Kg}$, para una concentración de Hb de 10 μM en disolución, los antioxidantes se añadieron en una concentración de 18,5 $\mu\text{g/mL}$. Los sistemas con las fracciones fenólicas fueron comparados con un control sin aditivos.

e) Preparación del músculo lavado.

El músculo lavado se preparó a partir de músculo de jurel según el procedimiento descrito por Richards & Hultin (2000). El músculo blanco se picó con una trituradora Kitchen Aid (Kitchen Aid Inc., MI, USA) y se lavó dos veces en agua, empleando una relación 1:3 (p/v). La mezcla se agitó con una espátula durante 2 min, se mantuvo en reposo durante otros 15 minutos y posteriormente se escurrió. A continuación el músculo se mezcló con disoluciones tampón, formadas por 50 mM de fosfato sódico, 0,12 M cloruro potásico y 5 mM de L-histidina, de pH 6,8. La relación músculo/disolución tampón fue 1:3 (p:v). La mezcla se homogenizó durante 1 min usando un Ultra Turrax, y se mantuvo sobre hielo durante 15 min. Tras la separación de las fases mediante centrifugación (15000 g, 4 °C, 20 min), el músculo se congeló a -80 °C hasta su utilización. La descongelación para la realización de los experimentos, se realizó poniendo en contacto las bolsas con agua fría. Tras la descongelación se añadieron 200 ppm de sulfato de estreptomicina para inhibir el crecimiento microbiano. La oxidación se inició con la adición de la Hb sobre el músculo lavado de jurel.

f) Determinación de peróxidos lipídicos en músculo lavado. Índice de peróxidos (PV)

El contenido de hidroperóxidos en músculo lavado se determinó mediante la adaptación del método de Chapman & Mackay (1949), sugerida por Buege & Aust (1978). Se tomaron 300 mg de músculo en un tubo de vidrio y se añadieron 5 mL de diclorometano/metanol (2:1) y 1 mL de agua Milli-Q. La mezcla resultante se homogenizó mediante agitación intensa en un vortex. La centrifugación a 1000 g durante 5 min, permitió la separación de la fase metanol/agua y el diclorometano. La fase superior de metanol/agua se eliminó mayoritariamente con una pipeta de vidrio y se recuperó una alícuota de volumen variable, en función de la cantidad de hidroperóxidos contenidos en la muestra, de la fase orgánica de diclorometano. La alícuota se completó hasta 2,7 mL con diclorometano y se añadieron 0,5 mL de metanol y 30 µL de una disolución acuosa de tiocianato amónico al 30 % (p/v). La adición de metanol evitó la formación de turbidez al incorporar las disoluciones acuosas en la fase orgánica de diclorometano. Finalmente, se añadieron 30 µL de una disolución acuosa de 2 mg/mL de FeCl₂·4H₂O, en HCl al 3,5 % y se determinó la absorbancia de la muestra a 500 nm, 3 min después de haber introducido el cloruro ferroso. Los blancos estuvieron compuestos por 2,7 mL de diclorometano y 0,5 mL de MeOH, 30 µL de tiocianato amónico al 30 % (p/v) y

30 μL de la disolución de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La recta de calibrado se construyó en el rango de concentraciones 1-14 μM de hierro férrico, empleando disoluciones conocidas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La concentración de hidroperóxidos se expresó en miliequivalentes de oxígeno por mg de lípido (meq $\text{O}_2/\text{mg lip}$). Para ello se consideró que 1 meq. de oxígeno se corresponde con 1 meq. de hierro férrico (Chapman & Mackay, 1949).

El porcentaje de grasa fue calculado a partir del extracto de diclorometano por diferencia de pesada según se describe en el apartado 1.3.2.8 del Capítulo 1.

g) Determinación de malondialdehído en músculo lavado. Índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El índice del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se determinó en los sistemas de músculo lavado, por adaptación del procedimiento descrito por McDonald y Hultin (McDonald & Hultin, 1987). Se preparó diariamente una disolución compuesta por ácido tricloroacético (TCA) al 15 % (p/v) y ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,375 %, en HCl 0,25 M. La disolución se calentó ligeramente para facilitar la disolución de los componentes. Después se añadieron 3 mL de BHT al 2 %, en etanol absoluto, por cada 100 mL de disolución de TCA/TBA. La adición de BHT, compuesto antioxidante sintético, tuvo como finalidad inhibir la rotura de los hidroperóxidos, catalizada por las hemoproteínas y el hierro libre, durante el calentamiento de las muestras. Se tomó una alícuota del músculo lavado (0,1-0,3 g), y se introdujo en un tubo de vidrio con 3,0 mL, de la disolución de TCA/TBA/BHT. El contenido del tubo se agitó inmediatamente con un vortex y la muestra se calentó en un baño de agua a 97 $^{\circ}\text{C}$, durante 15 min. Después del enfriamiento de las muestras, se centrifugaron a 1000 g y 6 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 min, para sedimentar la materia floculante. Finalmente, se midió la absorbancia del líquido sobrenadante a 532 nm. El 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que se hidroliza a malonaldehído (MDA) en medio ácido, se empleó como patrón para la realización de la recta de calibrado. Los datos se expresaron en μmol de MDA por Kg de músculo.

h) Determinación de la pérdida de color rojo en músculo lavado mediante colorimetría.

La relación entre la intensidad de color rojo en músculo de pescado y la oxidación lipídica ha sido estudiada en diversos trabajos y se ha comprobado que existe una pérdida de

color rojo en el músculo a la vez que aumenta la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación lipídica (Wetterskog & Undeland, 2004). Dicha pérdida de color, debida a la oxidación de la Hb para dar lugar a la formación de metHb, puede detectarse instrumentalmente mediante el decrecimiento del parámetro a^* de la medida colorimétrica.

En los experimentos realizados en músculo lavado se midieron las variaciones de color rojo (parámetro a^*), del color amarillo (parámetro b^*) y luminosidad (parámetro L) con un colorímetro Chroma Meter CR-200 (Minolta, Osaka, Japan). Para ello, las muestras de músculo picado, lavado y homogeneizado fueron introducidas en bolsas limpias y transparentes. Las medidas de las muestras se llevaron a cabo presionando el sensor del colorímetro sobre las bolsas y realizando tres medidas en diferentes localizaciones a lo largo de toda la muestra. El valor considerado fue la media de cada una de las tres medidas en cada uno de los parámetros. La estandarización del instrumento fue realizada midiendo sobre un plato de calibración introducido en una bolsa igual a las utilizadas para el almacenamiento de las muestras.

i) Análisis sensorial en músculo lavado de jurel

El análisis sensorial se llevó a cabo por un panel formado por 3-4 profesionales entrenados siguiendo el baremo indicado en la correspondiente directiva europea (DOCE, 1989), clasificando el olor en cuatro estadios de mayor a menor frescura: fresco, sin olor a fresco, olor rancio incipiente y olor rancio intenso.

2.2.1.3. Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía, o ANOVA (Sokal & Rohlf, 1981), ($p < 0,01$) y las medias se compararon con el método de la diferencia de los mínimos cuadrados (LSD, least-squares difference).

2.2.2. Resultados

2.2.2.1. Estudio del mecanismo de inhibición de la oxidación lipídica. Interacciones entre los aditivos naturales y el sistema antioxidante endógeno del músculo.

1. Interacción del Caf-OH con el α -TOH y el AA endógenos en músculo de pescado.

Para determinar la naturaleza de las interacciones entre el Caf-OH y el sistema antioxidante endógeno del músculo de pescado se diseñó un experimento con 5 sistemas según la metodología descrita en el apartado 2.1.2.4.1 de este capítulo: un control sin antioxidantes y 4 sistemas con distintas concentraciones de Caf-OH (10, 25, 50 y 100 ppm (p/p)). El seguimiento del deterioro oxidativo se llevó a cabo mediante la cinética de formación de productos primarios (PV) y secundarios (TBARS) de la oxidación además del análisis sensorial. Paralelamente a la determinación de estos índices, se analizaron los contenidos de α -TOH y AA en cada muestra.

La Fig. 2.17 muestra la cinética de la formación de los productos primarios y secundarios de la oxidación durante los 12 días de almacenamiento a 4 °C. Como ya se había comprobado en el en la primera parte del presente capítulo, el Caf-OH inhibió la oxidación lipídica en músculo y la actividad fue proporcional a la cantidad de antioxidante añadido. El período de inducción fue de 2 días en las muestras control, tanto para la formación de peróxidos (Fig. 2.17A) como de aldehídos (Fig. 2.17B). Los períodos de inducción en los sistemas con distintas concentraciones de Caf-OH fueron 3, 9 y 11 días para las muestras con concentraciones de antioxidante de 10, 25 y 50 ppm respectivamente. Las muestras con 100 ppm no mostraron un incremento significativo de las cantidades de productos de la oxidación, durante los 12 días de experimento. La Tabla 2.14 recoge los porcentajes de inhibición de la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación para cada uno de los sistemas. La aparición de la rancidez fue detectada sensorialmente, en las muestras control, en el tercer día. En cambio fue detectada tras 5, 10 y 11 días en los sistemas con 10, 25 y 50 ppm de Caf-OH respectivamente. En las muestras con 100 ppm no se detectaron olores asociados a la rancidez oxidativa durante los 12 días de almacenamiento.

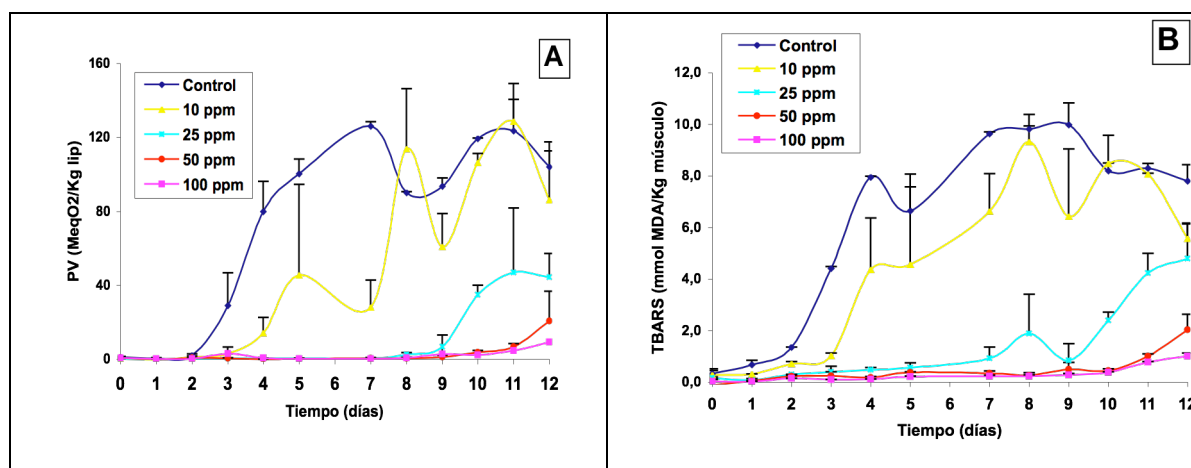


Figura 2.17: Evolución de la formación de hidroperóxidos lipídicos (A) y malondialdehído (B) en las muestras de músculo de jurel con distintas concentraciones de Caf-OH.

	<i>PV (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
4	82,1 ± 47,3	99,4 ± 11,3	100,0 ± 45,4	99,3 ± 92,4
5	54,6 ± 59,1	99,6 ± 29,8	99,7 ± 36,8	99,8 ± 48,9
7	77,7 ± 40,4	99,7 ± 63,5	99,6 ± 74,9	99,8 ± 79,1
8	-26,2 ± 7,5	97,2 ± 34,8	99,4 ± 74,0	99,3 ± 17,1
9	35,0 ± 10,3	92,9 ± 88,1	98,7 ± 63,5	97,1 ± 12,6
10	10,9 ± 0,5	70,8 ± 10,1	97,0 ± 29,7	98,0 ± 5,1
11	-4,2 ± 0,7	62,0 ± 45,9	94,6 ± 22,9	96,3 ± 8,9
12	17,3 ± 5,3	57,5 ± 16,8	80,2 ± 62,4	91,0 ± 3,3

	<i>TBARS (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
4	45,1 ± 20,6	93,9 ± 16,1	97,6 ± 17,4	98,5 ± 0,3
5	31,3 ± 24,1	91,4 ± 28,3	94,2 ± 3,5	96,8 ± 4,9
7	31,3 ± 6,9	90,4 ± 42,1	96,4 ± 26,8	97,6 ± 14,8
8	5,1 ± 0,6	80,9 ± 66,0	97,3 ± 33,6	97,7 ± 22,7
9	35,5 ± 14,4	91,6 ± 72,0	95,1 ± 53,0	97,2 ± 21,5
10	-3,5 ± 0,4	70,8 ± 9,3	94,6 ± 14,0	95,4 ± 5,8
11	2,9 ± 0,0	49,0 ± 8,7	87,9 ± 7,9	90,6 ± 1,3
12	28,6 ± 2,9	38,5 ± 10,9	74,0 ± 21,8	87,0 ± 9,5

Tabla 2.14: Porcentajes de inhibición de la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación tras la adición a músculo de jurel de distintas concentraciones de Caf-OH.

Las mismas muestras tratadas para monitorizar la oxidación lipídica fueron utilizadas para seguir los cambios en los niveles de los antioxidantes endógenos α -TOH y AA a lo largo del experimento. Como se observa en la Fig. 2.18 los niveles de α -TOH sufrieron una fuerte disminución dependiente de la cantidad de Caf-OH añadido a las muestras. Así, las muestras control mostraron una importante pérdida del antioxidante endógeno a partir del primer día consumiéndose totalmente tras 5 días de almacenamiento (Fig. 2.18). Los distintos sistemas con el antioxidante conservaron durante más tiempo los niveles iniciales de α -TOH. El α -TOH de las muestras con 10 ppm no comenzó a consumirse hasta el tercer día de almacenamiento (7,2 % de los valores iniciales tras cinco días) mientras que el sistema con 25 ppm conservó los niveles iniciales hasta el octavo día y el de 50 ppm hasta el décimo (Fig. 2.18). En las muestras con 100 ppm de Caf-OH no se observaron diferencias significativas en los niveles del antioxidante endógeno entre el primer y último día, ya que conservaron el 95 % de la concentración inicial

(Tabla 2.15). Los resultados mostraron, por tanto, que la presencia del ácido hidroxicinámico inhibió el consumo del α -TOH presente en el músculo y que ese retardo fue proporcional a la concentración de Caf-OH añadida.

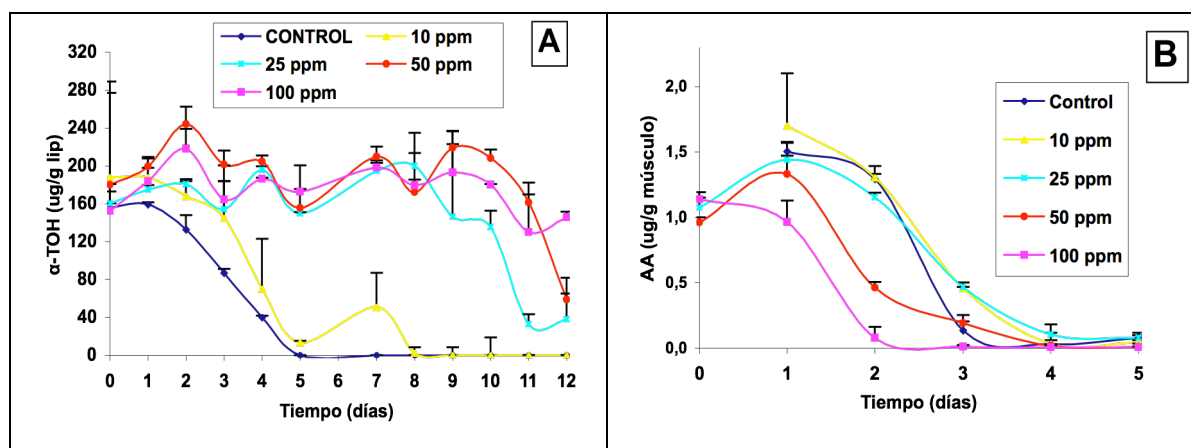


Figura 2.18: Evolución de los niveles de α -TOH (A) y AA (B) en músculo de jurel con diferentes concentraciones de Caf-OH añadido.

La cinética de consumo de AA fue diferente a la del α -TOH. Tras 4 días de almacenamiento los niveles de AA no superaron el 10 % de los valores iniciales en ningún sistema (Tabla 2.15), por lo que su consumo no estuvo relacionado con la oxidación lipídica. Como se muestra en la Fig. 2.18 el Caf-OH influyó en la cinética del AA pero, al contrario que en el caso del α -TOH, la adición del ácido hidroxicinámico incrementó la velocidad de consumo del antioxidante endógeno. El AA presente en las muestras con 100 ppm de Caf-OH fue el que se consumió más rápidamente (Fig. 2.18) seguido del de 50 ppm. Los niveles del antioxidante endógeno, tras dos días de almacenamiento, fueron del 7 % y del 48 % respectivamente, con respecto a los valores iniciales (Tabla 2.15). Las muestras con 10 y 25 ppm conservaron los niveles iniciales durante más tiempo y su velocidad de consumo fue similar a la de las muestras control. Por tanto, los resultados parecen indicar que la presencia de Caf-OH incrementó la velocidad de consumo del AA endógeno del músculo y que ésta fue proporcional a la cantidad de antioxidante añadida.

Día	<i>α-TOH (%)</i>					<i>AA (%)</i>				
	Control	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	Control	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
1	101,9	100,2	109,3	110,5	120,4	100,0	100,0	134,2	138,6	84,7
2	85,0	89,6	112,7	135,6	142,8	85,8	76,8	107,4	48,5	6,9
3	55,8	77,3	96,3	111,8	107,8	8,9	27,2	43,4	20,0	1,1
4	25,7	37,5	122,4	113,6	122,2	2,0	2,0	9,8	2,0	0,6
5	0,0	7,2	93,6	86,4	113,3	5,1	2,8	7,4	1,1	0,7
7	0,0	27,3	121,4	116,5	130,0					
8	0,0	1,5	124,9	95,8	117,8					
9	0,0	0,0	91,2	121,7	126,4					
10	0,0	0,0	84,7	115,6	118,0					
11	0,0	0,0	20,5	89,6	85,4					
12	0,0	0,0	23,6	32,8	95,3					

Tabla 2.15: Mantenimiento de los niveles de los antioxidantes endógenos (% con respecto a los niveles iniciales en cada uno de los sistemas).

2. Interacción de la fracción IVU, procedente de bagazo de uva, con el α -TOH y el AA endógenos en músculo de pescado.

Al igual que en el caso del Caf-OH, se diseñó un experimento con el fin de elucidar la posible interacción entre la fracción IVU y los antioxidantes endógenos del músculo, α -TOH y AA. Del mismo modo se diseñó un experimento con músculo de jurel picado y almacenado a 4 °C. El experimento fue dividido en 5 sistemas con distintas concentraciones de IVU entre 0 (muestras control) y 100 ppm. La oxidación fue monitorizada mediante el seguimiento de la formación de peróxidos lipídicos y aldehídos, al mismo tiempo que se monitorizaron los niveles de α -TOH y AA.

La Fig. 2.19 muestra la evolución de la oxidación lipídica mediante los índices PV y TBARS. La fracción IVU fue un antioxidante eficaz inhibiendo el deterioro oxidativo y, al igual que en el caso del Caf-OH, esa inhibición fue proporcional a la concentración en el músculo. Las muestras control mostraron un período de inducción de 2 días, tanto en la formación de hidroperóxidos como de malondialdehído. Los períodos de inducción de las muestras con 10 y 25 ppm de IVU fueron de 3 días aunque la velocidad de formación de los productos primarios y secundarios fue mayor en el sistema con 10 ppm. Mientras que las muestras con 25 ppm inhibieron la formación de peróxidos y malondialdehído en un 75 % y un 28 % respectivamente en el quinto día de almacenamiento, la adición de 10 ppm consiguió inhibir únicamente el 3 % y el 4 % con respecto a las muestras control (Tabla 2.16). Como muestra la Fig. 2.19, la adición de 50 y 100 ppm inhibió la oxidación de una manera más eficaz que en los demás sistemas. Los

períodos de inducción para las muestras con 50 ppm fueron 5 días en PV y 6 días para TBARS. Las muestras con 100 ppm no se oxidaron de manera significativa en los 13 días de almacenamiento, inhibiendo la formación de peróxidos en un 97 % y de malondialdehído en un 80 % con respecto a las muestras control. Estos resultados fueron coincidentes con la detección sensorial de la rancidez ya que esta se produjo tras 2 días en las muestras control y con 10 y 25 ppm de IVU (en estas últimas de manera incipiente) mientras que las muestras con 50 ppm no mostraron olores asociados a la rancidez hasta el séptimo día (también de manera incipiente). Finalmente, las muestras con 100 ppm no mostraron rancidez tras los 13 días de duración del experimento.

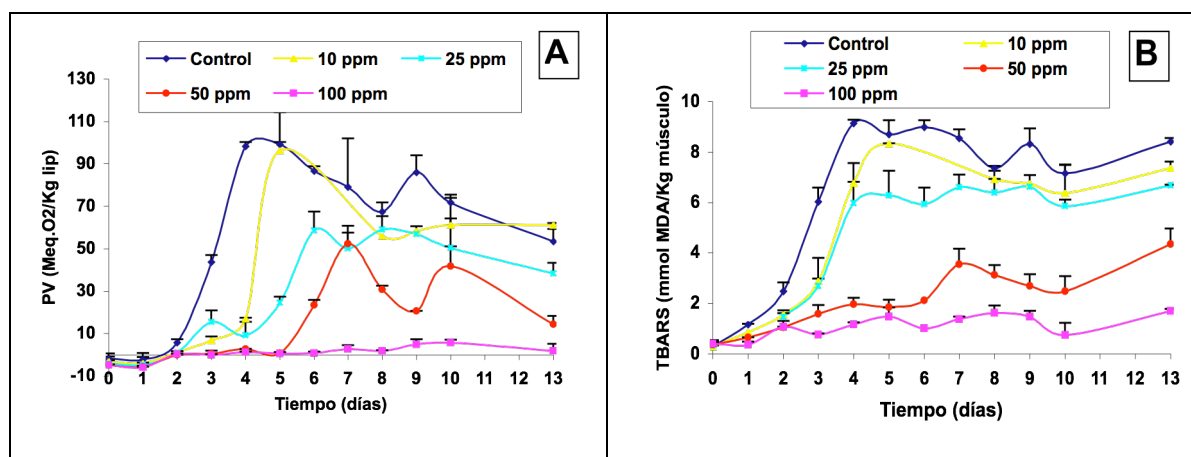


Figura 2.19: Evolución de la formación de hidropéroxidos lipídicos (A) y malondialdehído (B) en las muestras de músculo de jurel con distintas concentraciones de Fracción IVU.

	<i>PV (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
4	82,8 ± 2,9	90,7 ± 62,5	97,3 ± 1,8	98,7 ± 15,5
5	2,9 ± 0,5	75,3 ± 8,4	99,3 ± 0,5	99,4 ± 90,4
6	-	32,4 ± 4,9	72,9 ± 7,2	99,0 ± 77,2
7	-	36,6 ± 7,4	34,0 ± 3,4	96,5 ± 57,3
8	17,0 ± 0,9	12,4 ± 1,3	54,4 ± 2,9	97,3 ± 11,4
9	31,9 ± 0,4	33,8 ± 2,2	76,1 ± 0,3	94,4 ± 45,8
10	14,5 ± 0,0	29,8 ± 0,5	41,6 ± 33,3	92,1 ± 23,0
13	-14,9 ± 15,9	28,3 ± 3,8	72,9 ± 19,6	96,6 ± 18,9

	<i>TBARS (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
4	25,9 ± 0,1	34,8 ± 9,3	78,4 ± 9,2	87,2 ± 5,6
5	4,2 ± 0,0	27,9 ± 4,4	78,7 ± 12,3	83,0 ± 19,4
6	-	34,0 ± 3,8	76,5 ± 0,0	88,7 ± 0,0
7	-	22,6 ± 1,7	58,4 ± 9,9	83,9 ± 5,3
8	6,1 ± 1,0	13,2 ± 1,1	57,6 ± 7,0	78,1 ± 14,4
9	18,9 ± 0,7	20,6 ± 1,4	67,6 ± 11,2	82,3 ± 12,3
10	10,9 ± 0,8	18,2 ± 0,8	65,4 ± 15,5	89,5 ± 56,2
13	12,4 ± 0,2	20,5 ± 0,1	48,3 ± 6,7	79,8 ± 3,4

Tabla 2.16: Porcentajes de inhibición de la formación de productos primarios y secundarios de la oxidación tras la adición de distintas concentraciones de IVU.

La evolución del consumo de los antioxidantes endógenos α -TOH y AA a lo largo del experimento se muestran en la Fig. 2.20. Al igual que en el caso del Caf-OH, los niveles de α -TOH se mantuvieron de manera proporcional a la cantidad de fracción IVU añadida. Las muestras control y las que contenían tan solo 10 ppm de aditivo mostraron una cinética similar en cuanto a la pérdida del antioxidante endógeno, consumiéndose totalmente tras 2 días en el caso de los controles y conservándose tan solo un 32 % (Tabla 2.17) en los sistemas con 10 ppm, en el mismo período de tiempo. Como se puede observar en las Fig. 2.19A y 2.19B, la pérdida del antioxidante endógeno, α -TOH, coincidió con el comienzo de la oxidación lipídica en los distintos sistemas.

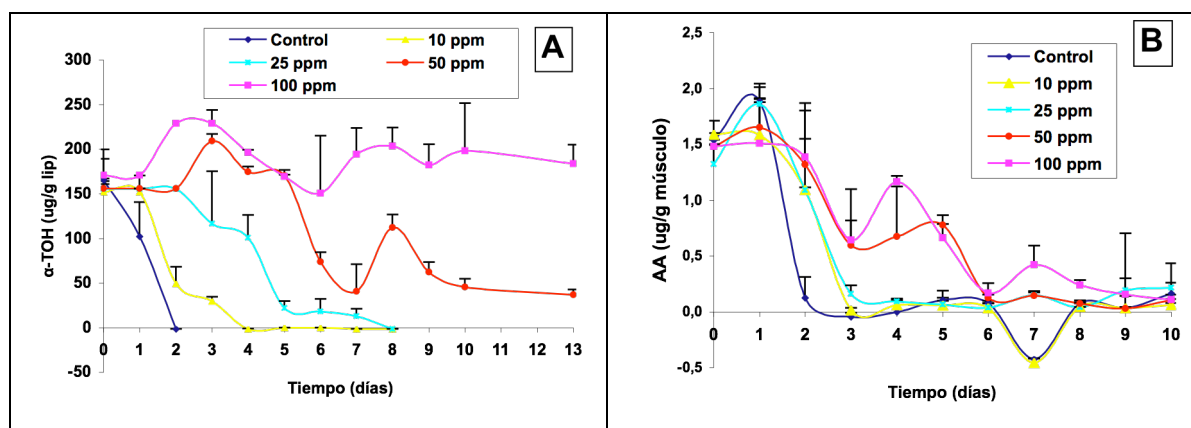


Figura 2.20: Evolución de los niveles de α -TOH (A) y AA (B) en músculo de jurel con diferentes concentraciones de IVU añadido.

Las cinéticas del AA mostraron una tendencia similar a la del α -TOH manteniéndose durante más tiempo en aquellas muestras con mayor concentración de procianidinas. El AA de las muestras sin antioxidantes se consumió tras 2 días de almacenamiento (Fig. 2.20) coincidiendo con el fin del período de inducción en los análisis sensorial, PV y TBARS. Los sistemas con 10 y 25 ppm de IVU presentaron un 1 y un 12 % de los niveles iniciales del antioxidante endógeno en el tercer día de experimento (Tabla 2.17) mientras que el consumo de AA en los sistemas con 50 y 100 ppm de IVU fue más secuencial comenzando a consumirse tras 2 días (Fig. 2.20), pero mostrando un 5 y un 16 % de los niveles iniciales tras 8 días de almacenamiento (Tabla 2.17). Estos resultados evidenciaron, a diferencia de los obtenidos tras la adición de Caf-OH, que la adición de la fracción IVU provocó un retardo en el consumo del AA endógeno.

Día	<i>α-TOH (%)</i>					<i>AA (%)</i>				
	Control	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm	Control	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
1	61,5	100,0	100,0	100,0	100,0	122,7	99,8	140,5	111,6	101,9
2	0,0	32,5	100,0	100,0	134,1	8,0	69,0	82,3	89,2	93,4
3	-	19,7	75,1	134,3	134,1	0,0	0,9	12,0	40,2	43,3
4	-	0,0	64,8	112,0	115,0	0,0	3,7	7,1	45,6	78,6
5	-	-	14,2	109,3	99,2	6,9	3,6	4,9	52,5	44,8
6	-	-	11,7	47,5	88,3	5,0	2,1	2,8	8,3	11,4
7	-	0,0	8,4	26,0	113,8	0,0	0,0	11,1	9,7	28,5
8	-	0,0	0,0	71,9	119,2	5,0	2,8	3,0	4,8	16,2
9	-	-	-	40,0	106,8	2,2	2,0	14,4	1,9	10,5
10	-	-	-	29,2	116,1	-	-	-	-	-
13	-	-	-	23,8	107,6	-	-	-	-	-

Tabla 2.17: Mantenimiento de los niveles de los antioxidantes endógenos (con respecto a los niveles del día 0 en cada uno de los sistemas).

Los resultados obtenidos en este experimento mostraron que la fracción IVU procedente de bagazo de uva interactuó con el sistema antioxidante endógeno del músculo tanto de tipo lipofílico como hidrofílico. La adición de las procianidinas disminuyó la velocidad de consumo del α -TOH, confirmando los resultados obtenidos por Pazos (2005) y por Pazos, Gallardo, Torres & Medina (2005), en los que se concluyó que uno de los mecanismos por los que la fracción IVU ejerce su actividad antioxidante es la protección de los antioxidantes endógenos. A diferencia de lo observado con el Caf-OH, la adición de la fracción polifenólica también fue capaz de inhibir el consumo del AA y esta protección fue proporcional a la concentración de procianidina añadida.

2.2.2.2. Interacción de las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis con el sistema prooxidante endógeno del músculo. La Hemoglobina.

1. Velocidad de autooxidación de hemoglobinas procedentes de las especies pescadilla, jurel y lubina.

Existen numerosos estudios que muestran que la Hb de ciertas especies presentan una mayor actividad prooxidante que las de otras especies. Debido a que la velocidad de autooxidación es un factor trascendental en la actividad prooxidante de las Hbs de pescado, en este apartado se estudió el comportamiento de Hbs extraídas de pescadilla, jurel y lubina en una disolución acuosa de pH controlado. Para ello se prepararon distintas disoluciones de Hb (a partir del hemolizado) de concentración 10 μ M, en disoluciones de KCl y L-histidina ajustada a pH 6,8, y se almacenaron a 4 °C. Se realizó un seguimiento de la formación de metHb mediante la aplicación de la ecuación de Winterbourn (1990) y midiendo la reducción de la intensidad del pico característico a 576 nm.

La Fig. 2.21 muestra los espectros obtenidos de las tres Hbs en el momento del comienzo del experimento y tras 50 horas de almacenamiento a 4 °C. Las diferencias resultaron significativas desde las primeras horas de almacenamiento. Tras 50 horas (Fig. 2.21) se observó como en la Hb de pescadilla se redujo considerablemente la diferencia entre las absorbancias a 576 y 560 nm, lo que indica una menor concentración de Hb oxigenada, al mismo tiempo que aumentó la banda a 630 nm, donde se encuentra el máximo de absorción de la metHb. Las Hb de jurel y lubina se mantuvieron más estables a lo largo del experimento, aunque se observaron diferencias, si bien no significativas, a partir de las 50 horas. Debido a que el jurel ha sido la especie utilizada a lo largo de esta tesis, y a la reducida velocidad de oxidación, que posibilita un estudio más claro de los mecanismos que rigen su actividad prooxidante, nos decantamos por la utilización de Hb de jurel en los experimentos posteriores.

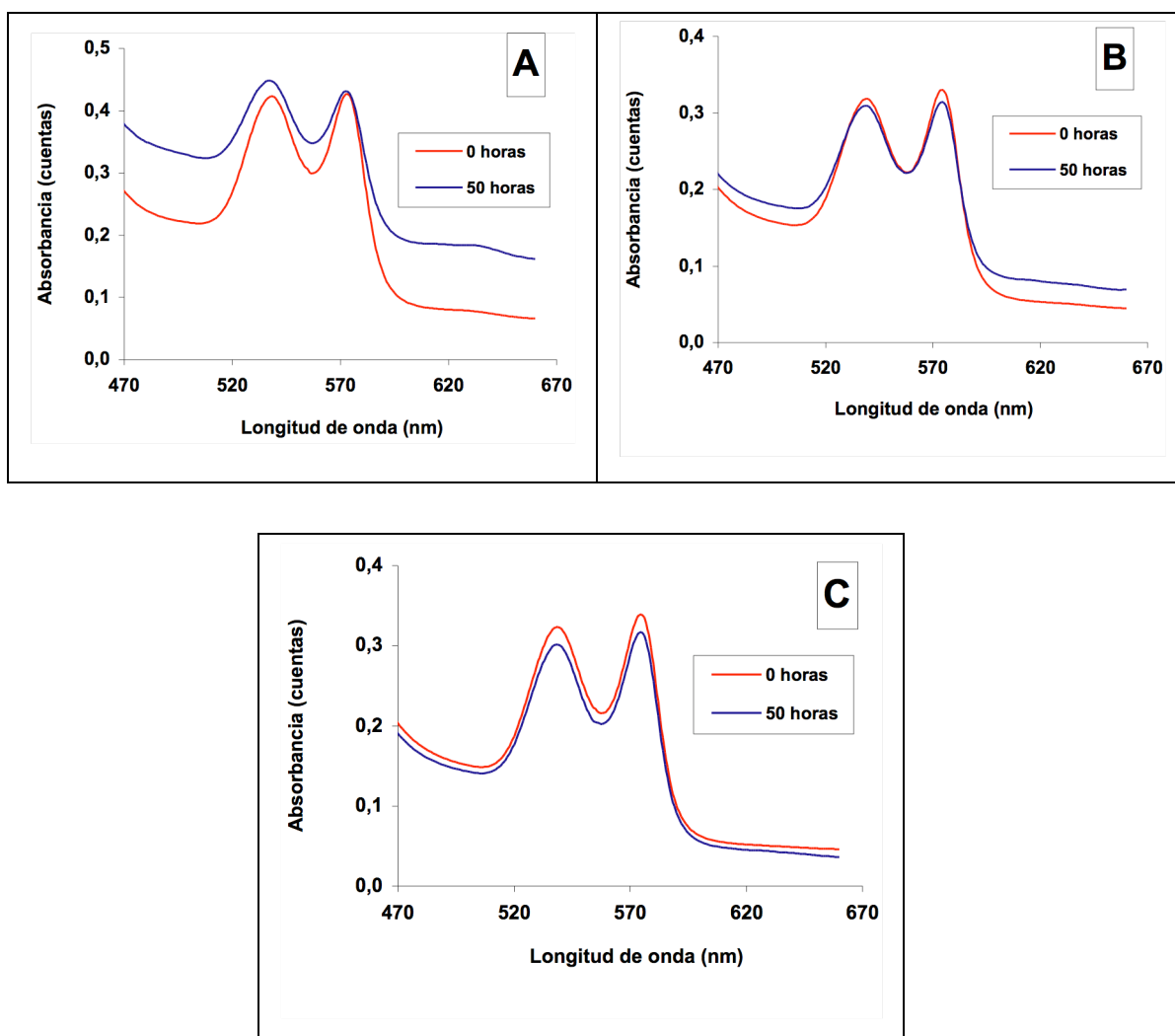


Figura 2.21: Espectros de absorción de las Hbs de pescadilla (A), jurel (B) y lubina (C) al comienzo del experimento y tras 50 horas de almacenamiento a 4 °C.

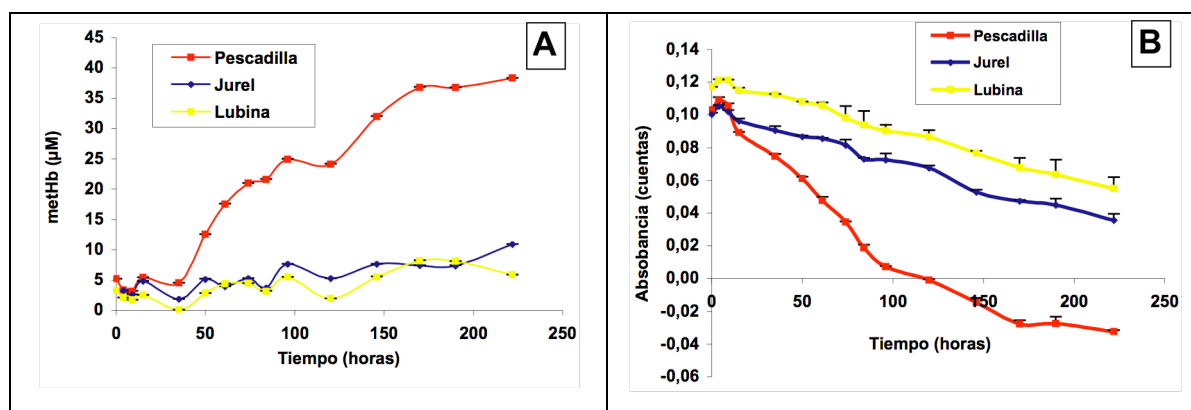


Figura 2.22: Cinéticas de autooxidación de la Hb mediante la medida de formación de metHb (A) y la diferencia de absorbancia entre el pico a 576 nm y el valle a 560 nm (B) en el espectro de absorción.

2. Estudio de la velocidad de autooxidación de Hb en función del pH.

Se estudió como la velocidad de autooxidación, y por lo tanto la actividad prooxidante de la Hb de jurel, se vio afectada por el pH en un sistema in vitro, en un rango que incluye las variaciones que se producen durante el almacenamiento del músculo post-mortem (6-7,2) (Undeland, Kristinsson & Hultin, 2004). Esa dependencia fue seguida mediante la cinética de formación de metHb en disoluciones tampón, a distintos pHs y almacenadas a 4 °C con una concentración inicial de Hb de jurel de 10 μmol/L. La Fig. 2.23 muestra los diferentes espectros obtenidos de todos los sistemas tras 0 y 79 horas de almacenamiento. Las dos bandas con máximos entre los 500 y 600 nm son características de la oxiHb mientras que la metHb muestra su máximo de absorción a 630 nm. Al comienzo del experimento ya se observó un ligero descenso en la concentración de oxiHb almacenada a pH 6, con respecto a las restantes muestras, al mismo tiempo que se observó un aumento en la concentración de metHb. Durante el desarrollo del experimento la autooxidación de la Hb fue fuertemente acelerada a este pH con respecto a las restantes disoluciones (Fig. 2.24) derivando, en las últimas horas de almacenamiento, en la formación de un precipitado de color rojo. Este precipitado sería consecuencia de la formación de una sustancia denominada hemicromo, resultado de la unión, a una de las seis posiciones de coordinación de la molécula de metHb, de un ligando como la histidina o un grupo -OH. La formación de esta sustancia es la primera etapa en la

desnaturalización de la proteína, y posterior formación del precipitado (Baron & Andersen, 2002). La turbidez provocada por la presencia de este sólido, pudo ser la causa de la sobreestimación en la concentración de metHb al final del experimento, superando la concentración molar inicial de Hb (10 μM). En todos los sistemas se observó una relación lineal entre el aumento de la concentración de metHb y el tiempo. La Fig. 2.24 muestra la velocidad de formación de metHb, (pendiente de la recta, tras la representación de la formación de metHb con el tiempo) frente al pH. La velocidad de autooxidación a pH 6 fue muy superior a las restantes. La velocidad de formación de metHb fue mucho menor entre 6,58 y 8,25 y disminuyó muy ligeramente a medida que se incrementó el pH. En estos sistemas se observaron cantidades importantes de oxiHb (Fig. 2.23) al final del experimento.

Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron la existencia de una fuerte correlación entre el incremento de velocidad de autooxidación de la Hb de jurel y el pH. Esta dependencia es de gran importancia debido a la drástica reducción de pH que se produce en el músculo tras la muerte del pescado y las consecuencias a las que conduce la autooxidación de la hemoproteína en procesos de oxidación lipídica debido al incremento de la actividad prooxidante.

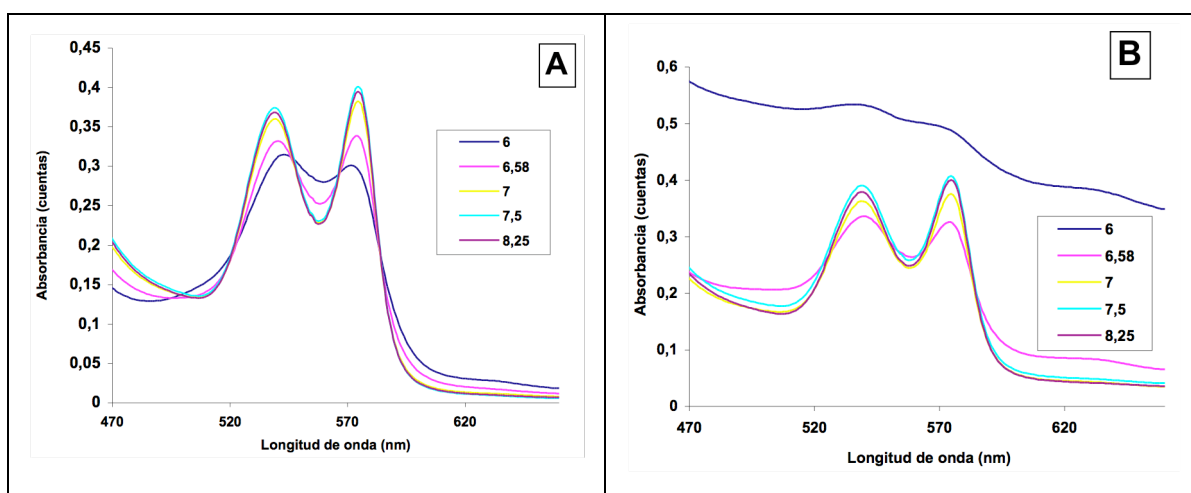


Figura 2.23: Espectros de absorción de disoluciones de Hb a distintos pHs tras 0 (A) y 79 (B) horas de almacenamiento a 4 °C.

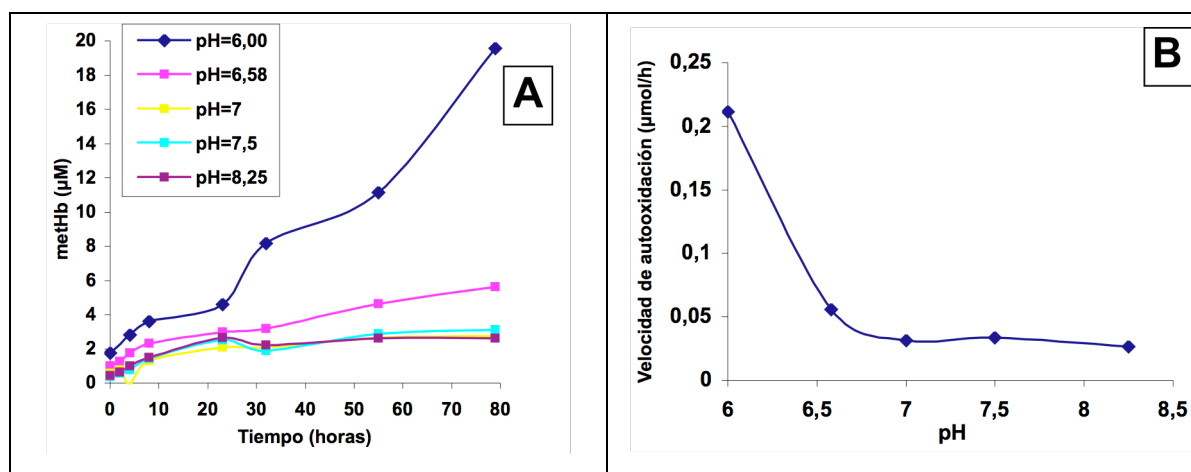


Figura 2.24: Cinéticas (A) y velocidades de formación (B) de metHb a distintos pHs.

3. Autooxidación de Hb en presencia de antioxidantes procedentes de bagazo de uva corteza de pino y corteza de Hamamelis.

Se estudió la influencia de los antioxidantes procedentes de corteza de pino, bagazo de uva, corteza de Hamamelis, sobre la oxidación de Hb de jurel en ensayos in vitro (disoluciones 10 μM de KCl y L-histidina). El pH fue ajustado a 6,8 unidades con NaOH, para simular las condiciones del músculo de pescado inmediatamente después de la muerte. Al igual que en el estudio de la influencia del pH, todas las muestras fueron almacenadas a 4 °C y se midió la velocidad de formación de metHb además de la reducción de la banda con máximo a 576 nm a lo largo del tiempo.

Todas las fracciones potenciaron la oxidación de la Hb con respecto al sistema sin aditivo (Fig. 2.25). Las fracciones procedentes de corteza de pino fueron las menos activas mientras que las fracciones galoizadas de uva y Hamamelis resultaron las más prooxidantes. El orden de actividad estuvo relacionado con las características químicas de las distintas fracciones. Éstas aumentaron la velocidad de formación de metHb en el orden $IVH \geq IVU \geq IVP$, coincidiendo con el incremento en las propiedades antiradicalaria, reductora, quelatante y del carácter lipofílico. Estos resultados constituyen una paradoja con respecto a los estudios de la actividad antioxidante de las procianidinas sobre músculo de pescado. El incremento de la velocidad de oxidación de la Hb, observada en este sistema in vitro, supondría un incremento de la actividad prooxidante de la hemoproteína y por lo tanto la adición de las distintas fracciones

aceleraría el proceso de oxidación lipídica en músculo de pescado, contradiciendo los resultados observados en el apartado 2.1. del presente capítulo.

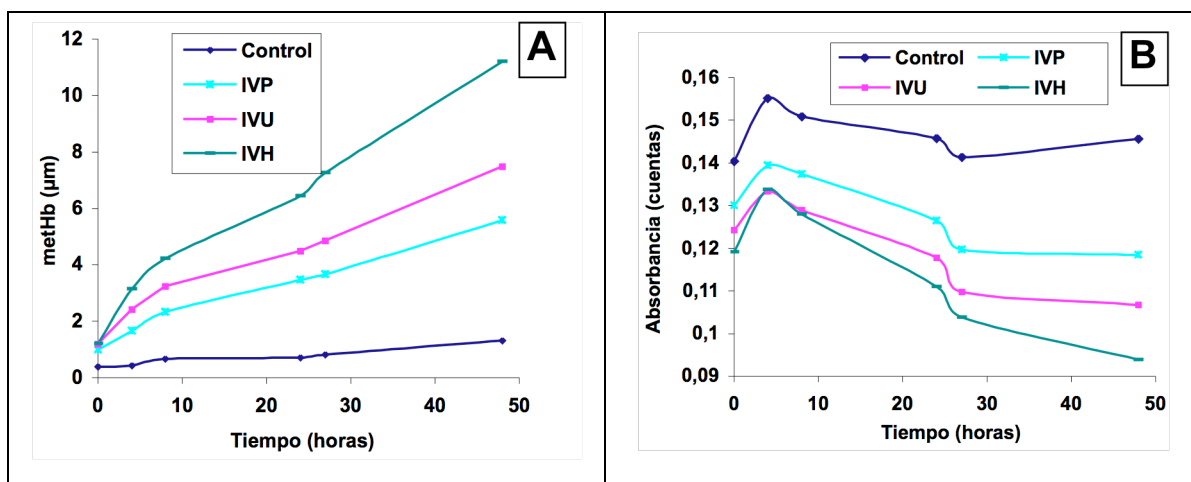


Figura 2.25: Cinética de autooxidación de Hb en un sistema *in vitro* con distintos antioxidantes medida mediante la formación de methHb (A) y la diferencia de absorbancia entre pico a 576 nm y el valle a 560 nm del espectro.

4. Influencia de las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis sobre la oxidación lipídica catalizada por la Hb en músculo lavado.

Una vez estudiado el comportamiento de los distintos antioxidantes sobre la oxidación de la Hb en sistemas *in vitro* se ensayó su comportamiento sobre la oxidación promovida por la Hb en un sistema modelo de músculo lavado de jurel. En los experimentos que se describen a continuación se evaluó la eficacia de las fracciones purificadas (IVP, IVU y IVH) procedentes de pino, uva y Hamamelis sobre la oxidación lipídica catalizada por Hb de jurel. Todos los experimentos fueron realizados según la metodología descrita en el apartado 2.1.2.4.1 del presente capítulo y las muestras fueron almacenadas en una cámara refrigerada a 4 °C.

a) Influencia de la concentración de Hb en la actividad prooxidante sobre músculo lavado

En una primera fase y con objeto de fijar las condiciones experimentales se llevó a cabo el estudio de la influencia de la concentración de Hb mediante el seguimiento de la oxidación de tres sistemas de músculo lavado de jurel a los que se les adicionó Hb de la misma especie en concentraciones de 5, 10 y 15 $\mu\text{mol/Kg}$ músculo. La oxidación fue seguida durante 3 días mediante el índice PV. Como se muestra en la Fig. 2.26, la concentración de Hb influyó de manera significativa en la formación de productos primarios de la oxidación. Las muestras con 15 μM de Hb se oxidaron rápidamente tras un día de almacenamiento. Los sistemas con 10 y 5 μmol de Hb/Kg también comenzaron a oxidarse tras el primer día, pero la velocidad de formación de peróxidos fue mucho menor. Estos resultados demostraron que la hemoproteína actuó como promotor de la oxidación y que su actividad dependió de la cantidad presente en el músculo. Los restantes experimentos sobre músculo lavado se llevaron a cabo utilizando la máxima concentración ensayada (15 $\mu\text{mol/Kg}$) con objeto de disminuir el tiempo de duración de los mismos.

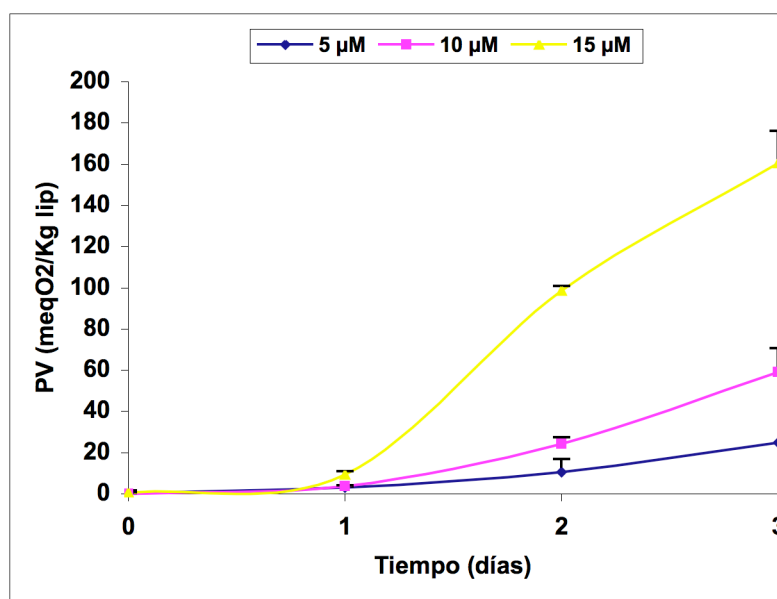


Figura 2.26: Cinética de formación de hidropéroxidos lipídicos en músculo lavado de jurel con distintas concentraciones de Hb.

b) Eficacia de las fracciones purificadas de pino, uva y Hamamelis en la inhibición de la oxidación promovida por Hb en músculo lavado.

Se estudió la eficacia de las distintas fracciones purificadas procedentes de corteza de pino (IVP), bagazo de uva (IVU) y corteza de Hamamelis (IVH), en la inhibición de la oxidación lipídica iniciada mediante la adición de Hb de jurel en músculo lavado de la misma especie. La hemoproteína fue homogeneizada en el músculo en una concentración final de 15 $\mu\text{mol/Kg}$, mientras que para las fracciones se utilizó una concentración de 50 $\mu\text{g/g}$ (p/p). Todas las fracciones se mostraron activas retardando la oxidación con respecto a las muestras control (Fig. 2.27). La evolución de la formación de peróxidos (Fig. 2.27A) mostró que los sistemas incrementaron de manera significativa el contenido de productos primarios de la oxidación entre los días 0 y 1 de almacenamiento. Sin embargo, la velocidad de formación no fue la misma en todos los sistemas. La fracción IVP fue la menos eficaz, mostrando un porcentaje de inhibición del 49 % (Tabla 2.18). Las fracciones IVU y IVH fueron las más eficaces, incluso durante el primer día, mostrando unos porcentajes de inhibición de peróxidos con respecto a los controles del 75 % y del 78 % respectivamente (Tabla 2.18). Las diferencias en la evolución de la oxidación lipídica se mostraron de una manera más clara en la cinética de formación de aldehídos. Las muestras control fueron de nuevo las que mostraron una mayor velocidad de formación de productos secundarios y todas las fracciones fueron eficaces inhibiendo el deterioro oxidativo. De nuevo, la fracción IVP fue la menos eficaz, mostrando, tras el primer día de almacenamiento, un porcentaje de inhibición de la formación de aldehídos del 30 % (Tabla 2.18) con respecto a las muestras control. Las fracciones IVU y IVH mostraron una mayor actividad, siendo la IVH la más eficaz, con respecto al extracto procedente de bagazo de uva. Como se muestra en la Tabla 2.18, los porcentajes de inhibición fueron del 69 % y del 81 % para uva y Hamamelis respectivamente tras un día de almacenamiento y del 8 % y del 39 % en el segundo día.

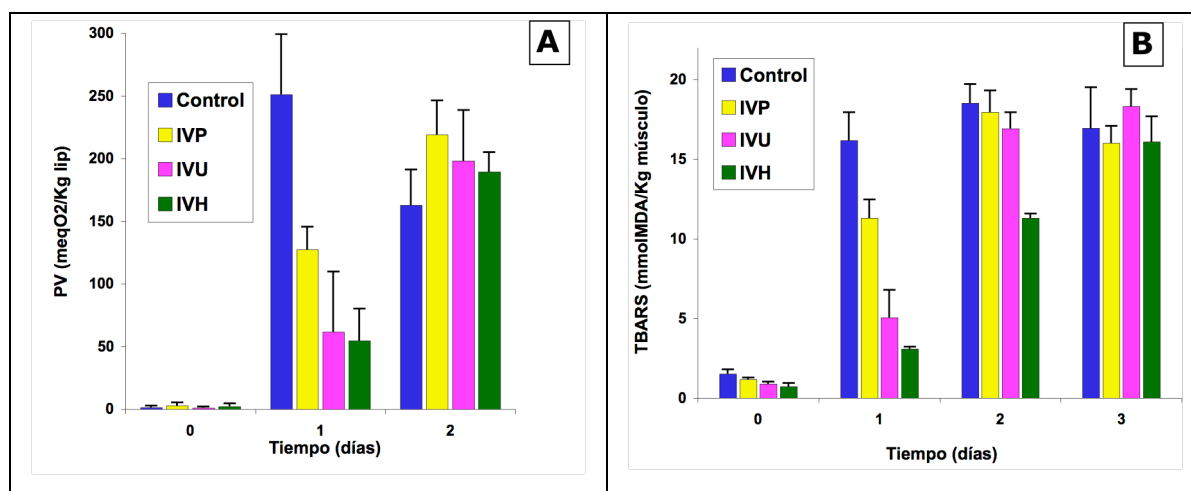


Figura 2.27: Cinética de formación de peróxidos lipídicos y malondialdehído en músculo lavado de jurel.

Día	PV (%)			TBARS (%)		
	IVP	IVU	IVH	IVP	IVU	IVH
1	49,3 ± 11,3	75,4 ± 18,2	78,2 ± 35,1	30,2 ± 8,4	68,8 ± 10,5	80,9 ± 2,9
2	-34,6 ± 2,1	-21,8 ± 7,1	-16,4 ± 1,8	3,0 ± 2,9	8,6 ± 0,2	39,0 ± 0,2

Tabla 2.18: Porcentajes de inhibición de la oxidación lipídica inducida por Hb medida mediante la formación de peróxidos y malondialdehído en músculo lavado de jurel.

Tras el primer día de almacenamiento, las muestras sin antioxidantes y con la fracción IVP mostraron olores característicos asociados a la rancidez. El sistema con la fracción IVU tan sólo presentó un olor rancio incipiente, mientras que en el sistema con IVH no se detectó rancidez hasta el segundo día de almacenamiento.

El descenso en la medida del parámetro a^* (intensidad de color rojo) se observó en todas las muestras desde el comienzo del experimento pero las velocidades fueron significativamente diferentes en cada uno de los sistemas (Fig. 2.28). Todas las fracciones ensayadas fueron eficaces inhibiendo la formación de metHb con respecto a las muestras control y el orden de actividad fue el mismo que en el caso de los productos primarios y secundarios de la oxidación, siendo de nuevo la fracción IVH la más eficaz inhibiendo la oxidación de la

hemoproteína (Control > IVP > IVU > IVH). La evolución de la medida colorimétrica coincidió, por tanto, con los resultados obtenidos mediante los índices clásicos de seguimiento del deterioro oxidativo, por lo que podría utilizarse como un método eficaz para el seguimiento de la oxidación lipídica en muestras de músculo de pescado.

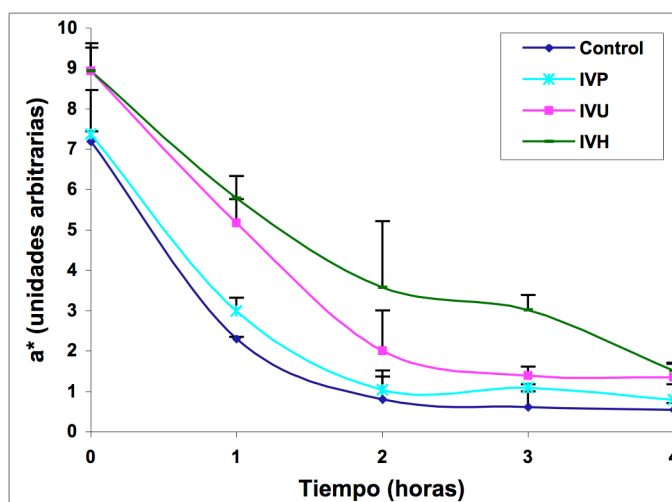


Figura 2.28: Evolución de la intensidad de color rojo (parámetro a^*) durante el almacenamiento de músculo lavado con Hb.

En lo referente a la evolución de los parámetros b^* y L, no se obtuvieron resultados significativamente diferentes entre los distintos sistemas.

Posteriormente, se realizó un estudio sobre la dependencia de la eficacia con la concentración de antioxidante. Se monitorizó el deterioro lipídico en 5 sistemas a los que se le añadieron distintas concentraciones de fracción IVU entre 0 (muestras control) y 100 $\mu\text{g/g}$ músculo. La oxidación fue iniciada mediante la adición de Hb de jurel en una concentración de 15 $\mu\text{mol/Kg}$. En la Fig. 2.29, que muestra la evolución de la formación de peróxidos y aldehídos en cada uno de los sistemas, se observa como la eficacia antioxidante fue proporcional a la concentración de procianidina añadida al músculo lavado. Las muestras con 10 ppm de IVU no consiguieron inhibir la oxidación con respecto a las muestras control e incluso, los valores de PV y TBARS fueron sistemáticamente superiores a los de las muestras sin antioxidante a lo largo de todo el experimento. En el resto de los sistemas, la eficacia fue proporcional a la cantidad de fracción polifenólica, siendo las muestras con 100 ppm las que mostraron un período de

inducción más largo (5 días en PV y TBARS), y los mayores porcentajes de inhibición tanto en la formación de peróxidos como de aldehídos (77 % y 70 % respectivamente (Tabla. 2.19)).

La rancidez fue detectada sensorialmente tras un día de almacenamiento en las muestras control y con 10 ppm de IVU. Las muestras con 25 ppm fueron más eficaces retardando la aparición de los olores asociados a la oxidación los cuales fueron detectados en el segundo día. La rancidez fue detectada tras 5 días en el sistema con 50 ppm y en el último día en las muestras con 100 ppm, en este último caso, tan solo de manera incipiente.

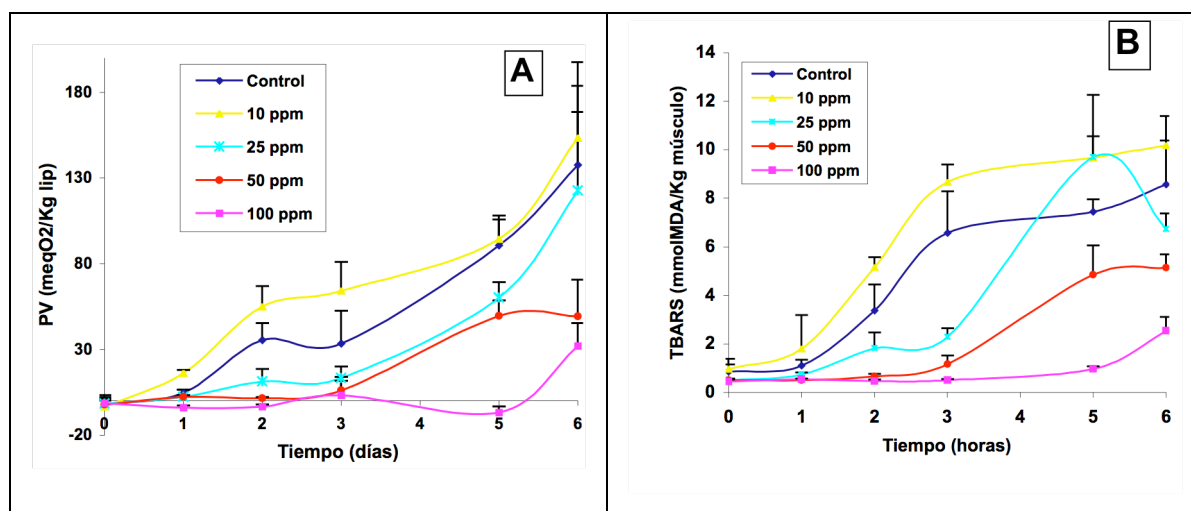


Figura 2.29: Cinética de formación de peróxidos (A) y malondialdehído (B) en muestras de músculo lavado con distintas concentraciones de fracción IVU.

	<i>PV (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
3	-91,5 ± 23,8	60,2 ± 30,1	81,6 ± 12,5	90,3 ± 17,8
5	-4,3 ± 0,6	33,5 ± 5,0	45,3 ± 8,2	107,4 ± 15,5
6	-11,4 ± 3,3	11,0 ± 4,1	64,3 ± 7,8	76,8 ± 21,9

	<i>TBARS (%)</i>			
Día	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
3	-31,7 ± 2,6	65,1 ± 9,6	82,5 ± 25,6	92,5 ± 7,5
5	-30,1 ± 2,7	-30,5 ± 8,0	34,8 ± 8,6	87,0 ± 9,4
6	-18,8 ± 2,2	21,4 ± 2,0	39,9 ± 4,2	70,3 ± 15,3

Tabla 2.19: Porcentajes de inhibición de la formación de peróxidos y malondialdehído con respecto a las muestras control.

Además del seguimiento del deterioro lipídico mediante los índices PV, TBARS y sensorial, se monitorizó la evolución del parámetro a^* medido mediante colorimetría, con el objetivo de evaluar la velocidad de oxidación de la Hb en relación a la cantidad de fracción IVU añadida sobre el músculo. Como se muestra en la Fig. 2.30 la fracción IVU consiguió retardar la formación de metHb con respecto a las muestras control, y esa eficacia fue proporcional a la cantidad de antioxidante añadido, a excepción de las muestras con 10 ppm. La adición de 10 ppm no consiguió retardar la oxidación de la hemoproteína con respecto a las muestras control, e incluso, la formación de metHb se llevó a cabo a mayor velocidad que en el sistema control. De nuevo, la medida colorimétrica estuvo relacionada con la oxidación lipídica, mostrando una mayor velocidad de formación de metHb en los sistemas con mayor susceptibilidad al deterioro lipídico.

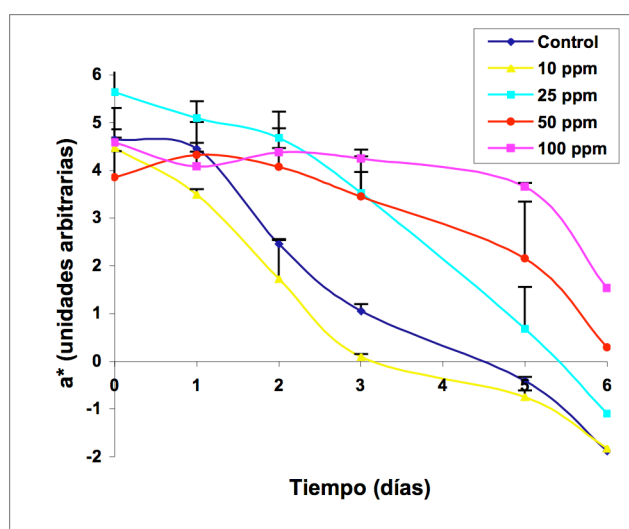


Figura 2.30: Evolución del parámetro a^* (intensidad de rojo) en los distintos sistemas con diferentes concentraciones de fracción IVU.

Al igual que en el experimento anterior los parámetro b^* (intensidad de amarillo) y L (luminosidad) no mostraron ninguna relación con la oxidación o con los cambios en la Hb añadida a las muestras.

El estudio llevado a cabo en este capítulo mostró la eficacia de las fracciones purificadas procedentes de pino, uva y Hamamelis para inhibir la oxidación lipídica promovida por la Hb. El

orden de eficacia fue el mismo que se obtuvo en los experimentos realizados sobre músculo picado y no lavado. Al contrario que lo observado en los experimentos in vitro, la medida colorimétrica de la intensidad de color rojo demostró que todas las fracciones consiguieron retardar la oxidación de la Hb, siendo éste uno de los posibles mecanismos de las procianidinas para prevenir la oxidación lipídica. La fracción IVU procedente de bagazo de uva fue eficaz inhibiendo la oxidación lipídica iniciada mediante la adición de Hb y su actividad fue proporcional a la cantidad de aditivo antioxidante añadido. Del mismo modo, el análisis colorimétrico demostró que la adición de la fracción redujo la velocidad de oxidación de la hemoproteína y que esa inhibición también fue proporcional a la concentración del antioxidante. La adición del antioxidante en una concentración de 100 ppm no provocó la variación de parámetros organolépticos como el olor o el color del músculo, lo que posibilita su utilización en la concentración más eficaz ensayada sin provocar rechazo por parte del consumidor.

2.2.3. Discusión

1. Interacción de los antioxidantes naturales con el sistema antioxidante endógeno del músculo de pescado. El α -TOH y el AA.

Se ha postulado que el α -TOH es la última defensa que posee el músculo de pescado contra la oxidación lipídica (Pazos, Sánchez & Medina, 2005), y que ésta comienza una vez que el antioxidante endógeno se ha consumido completamente. Este hecho ha sido corroborado en nuestros experimentos ya que, en todos los casos, la pérdida del antioxidante endógeno delimitó el comienzo del deterioro lipídico. La adición de los antioxidantes fenólicos, Caf-OH y IVU, provocó la reducción de la velocidad de consumo del antioxidante endógeno con respecto a los controles y, en ambos casos, esta protección fue proporcional a la cantidad de aditivo añadido. Trabajos recientes llevados a cabo en nuestro grupo confirmaron, mediante resonancia magnética de spin, la capacidad del Caf-OH para regenerar el α -TOH a partir del radical tocoferoxilo (Iglesias, Pazos, Andersen, Skibsted & Medina, 2009), tanto en soluciones homogéneas de hexano como en micelas. Del mismo modo, Pazos, Sánchez & Medina (2005) observaron la regeneración del antioxidante endógeno tras la adición de la fracción polifenólica IVU en músculo de pescado. Estos datos confirman que uno de los mecanismos por los cuales ambos compuestos fenólicos inhiben el deterioro oxidativo, es la protección del sistema endógeno del músculo. En este caso, la protección del α -TOH se llevó a cabo mediante la reducción del radical α -tocoferoxil (α -TO \cdot) según la reacción mostrada a continuación, donde Ph-OH representa el aditivo antioxidante fenólico (Caf-OH o fracción IVU):



A pesar de la naturaleza lipofílica del α -TOH, que provoca que el antioxidante se encuentre localizado en las membranas lipídicas, el grupo fenólico que forma parte de la molécula se orienta hacia la interfase lípido-agua. Esta disposición permite a la molécula interaccionar con las sustancias hidrofílicas disueltas en la fase acuosa, entre ellas los antioxidantes Caf-OH y la fracción IVU adicionados sobre el músculo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestros experimentos evidenciaron que además de la capacidad de neutralización de

radicales libres o de quelatación de metales catalizadores del proceso oxidativo, tanto el Caf-OH como la fracción polifenólica procedente de bagazo de uva, fueron capaces de proteger y regenerar el α -TOH endógeno presente en el músculo de pescado.

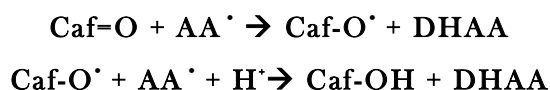
El AA es otro de los componentes hidrofílicos del sistema antioxidante endógeno del músculo. Además de su capacidad neutralizadora de radicales libres, reductora y quelatante, es capaz de proteger y regenerar el α -TOH como se ha descrito en varias publicaciones (Frankel, 1998, Niki, Tsuchiya, Tanimura & Kamiya, 1982). El estudio de las interacciones de los aditivos fenólicos con el AA endógeno, mostró resultados diferentes para el Caf-OH y para la fracción IVU procedente de bagazo de uva. Los experimentos descritos en esta memoria mostraron una fuerte disminución de los niveles de AA tras la adición del Caf-OH en relación a las muestras sin el aditivo, con una velocidad de consumo proporcional a la cantidad añadida. Estos datos sugieren un efecto protector de AA sobre el aditivo fenólico, de tal manera que el AA actuó cediendo electrones al Caf-OH mientras que el Caf-OH realizó lo propio sobre el α -TOH. La regeneración de un antioxidante exógeno por el AA ha sido observada también en el caso de la quercetina y otros flavonoides en ensayos *in vitro* (Bors, Michel & Schikora, 1995), o con diversos ácidos hidroxicinámicos en LDL (Laranjinha & Cadenas, 1999, Laranjinha, 2001, Vieira, Laranjinha, Madeira & Almeida, 1998).

De acuerdo con Buettner y Jurkiewicz (Buettner & Jurkiewicz, 1996), el pequeño valor del potencial reductor del AA ($E=0,28V$) permite la regeneración de un gran número de radicales. Entre estas sustancias se encontraría el Caf-OH, que presenta un potencial de reducción de 0,54 V, superior en valor al del antioxidante endógeno, lo que provoca que la regeneración del Caf-O \cdot por parte del AA endógeno sea termodinámicamente posible. Esta regeneración da lugar a la formación del radical ascorbilo (AA \cdot) que es eliminado en la fase acuosa por dismutación (Roginsky & Stegmann, 1994) o mediante la enzima reductasa (Buettner & Jurkiewicz, 1996). Laranjinha & Cadenas (1999) han sugerido otro mecanismo de desaparición del radical AA \cdot en presencia del ácido hidroxicinámico, en tres pasos. Si la concentración de Caf-O \cdot en el sistema es muy alta, el ácido hidroxicinámico podría regenerarse por dismutación según la reacción:



Finalmente la posterior reducción de la quinona Caf=O y del radical Caf-O \cdot mediante la acción del radical ascorbilo daría lugar a la formación del radical del Caf-OH y el AA. La

combinación del Caf-O[•] con el radical ascorbilo daría lugar a la regeneración del Caf-OH y a la formación de otra molécula de DHAA.



La rápida descomposición del AA presente en el músculo, mucho antes del consumo de α -TOH y del comienzo de la oxidación lipídica puede ser atribuido a la combinación de estos dos mecanismos de regeneración del Caf-OH.

La naturaleza de las interacciones entre el AA y los polifenoles contenidos en la fracción IVU resultó significativamente diferente a la observada en presencia de Caf-OH. La fracción polifenólica ejerció una protección sobre el AA similar a la mostrada sobre el α -TOH. Los sistemas con IVU mantuvieron durante más tiempo los niveles de AA que las muestras control, y esa protección fue proporcional a la cantidad de antioxidante añadido. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en las cinéticas del α -TOH, el consumo de AA se llevó a cabo antes del comienzo de la oxidación, por lo que no se observó una relación directa entre la desaparición del AA y el deterioro oxidativo. Esta reducción en la velocidad de consumo antioxidante endógeno podría deberse a la inhibición, por parte de la fracción IVU, de la formación de radicales procedentes de la oxidación lipídica o a la regeneración directa del antioxidante endógeno mediante un mecanismo análogo al de protección sobre α -TOH. Debido al reducido valor del potencial reductor del AA, este segundo mecanismo parece menos probable.

Los valores tabulados de los potenciales de reducción han sido medidos en sistemas acuosos de pH y temperatura controlados, y probablemente sean diferentes en un tejido complejo como el músculo de pescado. Tanto las interacciones entre el Caf-OH y AA como entre la fracción polifenólica IVU y AA no pueden, por tanto, ser justificadas plenamente mediante sus valores de los potenciales de reducción.

Como se ha mencionado anteriormente, la naturaleza polar o apolar de los aditivos antioxidantes, influye de manera importante en su actividad, especialmente en sistemas complejos como el músculo de pescado. Las interacciones con los componentes del sistema antioxidante endógeno dependen en gran medida de este parámetro ya que determina la distribución del aditivo en el músculo. La naturaleza hidrofílica del Caf-OH le permite situarse en las interfases fosfolípido-agua de las membranas celulares permitiendo tanto la interacción con el AA hidrofílico, como la reparación del α -TOH contenido en las membranas lipofílicas (con el anillo

fenólico orientado hacia la fase acuosa). En el caso de las procianidinas procedentes de bagazo de uva, su efectividad puede relacionarse con su capacidad para establecer interacciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas ya que, de manera similar al α -TOH, estas moléculas poseen un núcleo hidrofóbico y grupos hidroxilo de naturaleza hidrofílica, por lo que pueden exponer uno u otro lado de la molécula a cualquiera de las dos regiones (Torres et al., 2002), acumulándose en las interfases de las membranas y pudiendo interactuar con el sistema antioxidante endógeno tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica. Por tanto, la naturaleza polar de estos aditivos permite la interacción con ambos componentes del sistema antioxidante endógeno dando lugar a los mecanismos de protección que se muestran en las Figuras 2.31 y 2.32, incrementando significativamente su eficacia.

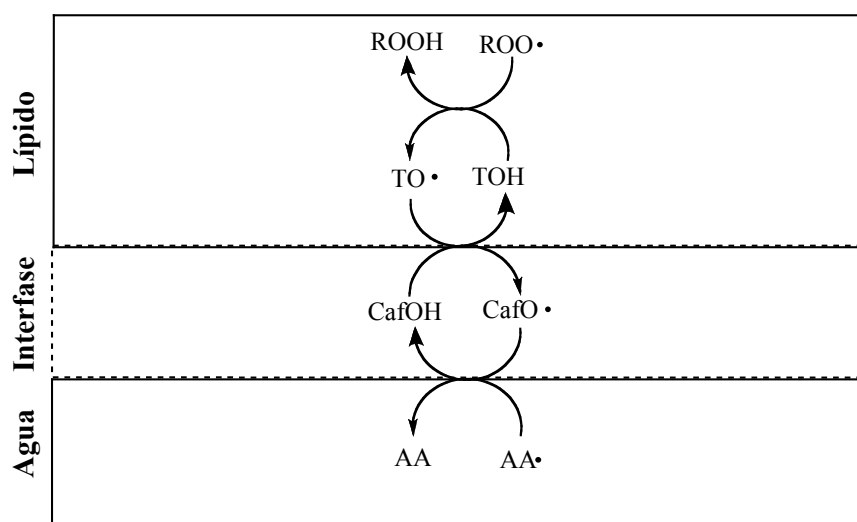


Figura 2.31: Ciclo redox del Caf-OH con el sistema endógeno del músculo de pescado.

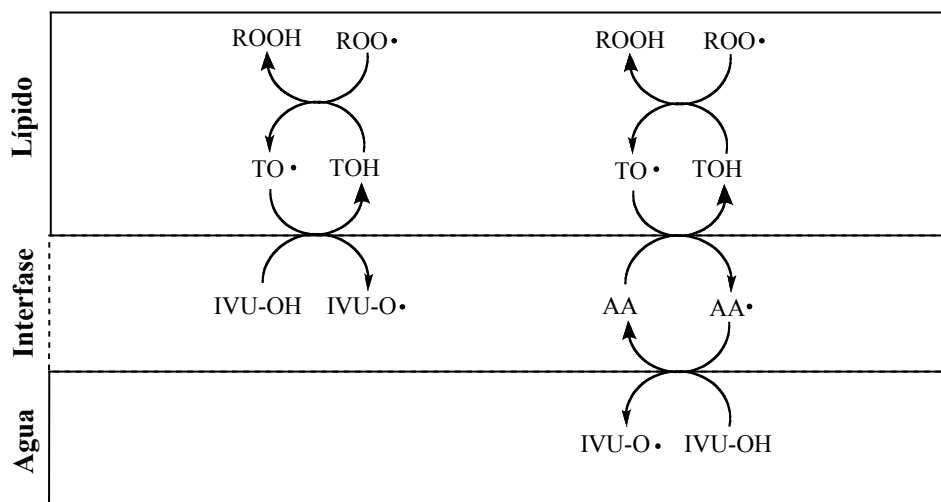


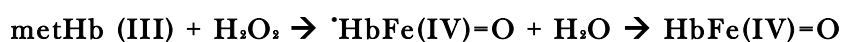
Figura 2.32: Ciclo redox de la fracción IVU (IVU-OH) con el sistema antioxidante endógeno del músculo de pescado.

2. Interacción de las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis con el sistema prooxidante endógeno del músculo de pescado. La hemoglobina.

Una de las reacciones más importantes relacionadas con la actividad prooxidante de las hemoproteínas (Hb o mioglobina) es la autooxidación para dar lugar a la formación de metHb y del radical superóxido:



A su vez, a partir del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) pueden formarse otras especies prooxidantes como el H_2O_2 cuya reacción con la metHb da lugar a la formación de los radicales perferrilo y ferrilo (estado de oxidación IV), que se encuentran entre los más importantes iniciadores de la oxidación lipídica (Baron & Andersen, 2002).



Existen evidencias de que la Hb en su forma desoxigenada es más fácilmente oxidable acelerando el proceso de deterioro lipídico (Richards & Hultin, 2000, Richards, Modra & Li, 2002, Richards, Ostvald & Andersen, 2002). La dependencia de la oxigenación con el pH es característico de Hbs “anódicas” (comportamiento en base a su movilidad electroforética) como las de salmón, arenque trucha o sardina. Los experimentos llevados a cabo con Hb de jurel evidenciaron un comportamiento de este tipo ya que las cantidades relativas de oxi- y desoxiHb fueron dependientes del pH como quedó reflejado en los espectros de absorción a día 0. El aumento de la velocidad de autooxidación observado en relación con el descenso del pH pudo deberse a varios factores. En primer lugar, Shikama (1998) sostiene que los protones reducen la energía de activación de la reacción de formación de metHb. Otros autores han sugerido que la desoxiHb, que aumenta su concentración al descender el pH, tiene más tendencia a oxidarse que su forma oxigenada debido a que el átomo de hierro del grupo hemo se encuentra desplazado fuera del plano de la porfirina (Stryer, 1988), aumentando su accesibilidad. Esta disposición permite una mayor interacción del grupo hemo con los hidroperóxidos lipídicos u otras sustancias como el H_2O_2 , dando lugar a la formación de radicales libres y metHb. Por último, el

descenso del pH causa la descomposición de la Hb en sus subunidades (Richards & Hultin, 2002), permitiendo la liberación del grupo hemo y aumentando la velocidad de formación de metHb.

La diferente secuencia de aminoácidos en Hbs de distintas especies determinan sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias y finalmente su carácter prooxidante. El estudio de la velocidad de autooxidación de las Hbs extraídas de pescadilla, jurel y lubina a pH 6,8 mostró diferencias significativas relacionadas con su afinidad por la oxigenación. La alta velocidad de formación de metHb en la pescadilla vino precedida de un nivel más bajo de oxiHb al comienzo del experimento. En base a los estudios realizados por Richards & Hultin (2003), las especies migratorias y con una alta velocidad de desplazamiento necesitan Hbs con una mayor inestabilidad, que sean capaces de liberar oxígeno más rápidamente. Entre este tipo de especies se encuentran la pescadilla y el jurel, lo que explicaría los mayores índices de desoxigenación y la mayor velocidad de autooxidación con respecto a la Hb de lubina. De la misma forma, encontraron que la actividad prooxidante de la Hb de jurel es mayor que la de trucha que es menos activa (Richards & Hultin, 2003). Sin embargo, Undeland, Kristinsson & Hultin (2004) mostraron como la Hb de abadejo resultó ser más prooxidante que las de jurel o menhaden a pesar de no ser una especie migratoria. Los mismos autores relacionaron la actividad prooxidante de las Hbs de pescado con la adaptación a la temperatura lo que explicaría esta observación, ya que el abadejo es una especie que habita en aguas profundas y a temperaturas reducidas. El conocimiento de las actividades de las diferentes Hbs es importante a la hora de abordar de manera diferente, y en función de la especie, las posibles estrategias para retardar el proceso de degradación lipídica.

A diferencia del carácter antioxidante que presentaron las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis en músculo de pescado, la adición sobre un sistema compuesto por una disolución acuosa de Hb de jurel mostró un comportamiento prooxidante sobre la hemoproteína. Las fracciones polifenólicas, por tanto, pueden comportarse como antioxidantes o prooxidantes dependiendo del medio en el que se encuentren y de la presencia de otras sustancias con actividad oxidante o reductora. Los compuestos fenólicos resultan eficaces inhibiendo la oxidación en músculo de pescado ya que son capaces de neutralizar radicales libres, quelatar metales catalizadores o mantener el sistema antioxidante endógeno. En los experimentos realizados en disolución acuosa, la actividad prooxidante de las procianidinas se llevaría a cabo mediante el mecanismo propuesto por Kondo, Kurihara, Miyata, Suzuki & Toyoda (1999) (Fig. 2.33). La formación de aniones superóxido, con alta actividad

prooxidante, mediante la cesión electrónica de las procianidinas al oxígeno disuelto (Fig. 2.33), explicaría esta actividad de las procianidinas sobre la Hb. En músculo de pescado, los mecanismos de inhibición de la oxidación lipídica y la generación del anión superóxido, serían procesos simultáneos (Fig. 2.33) y la actividad prooxidante/antioxidante dependería de la medida en que se produzca uno u otro proceso.

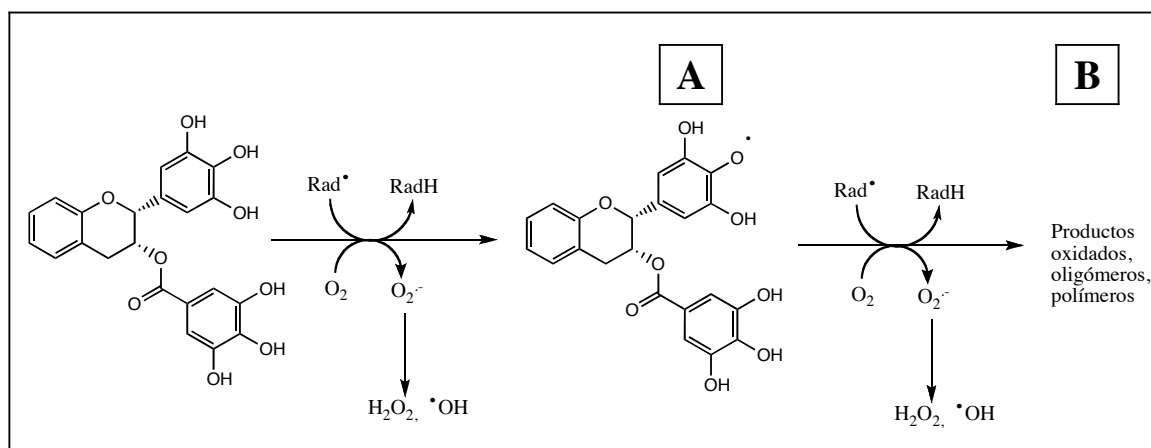


Figura 2.33: Mecanismos de neutralización de radicales y generación de aniones superóxido por parte de flavanoles con un grupo pirogalol en el anillo B.

En presencia de un sustrato lipídico como el músculo de pescado, la formación de los productos A y B (Fig. 2.33) se llevaría a cabo mediante la neutralización de radicales procedentes de la oxidación lipídica o del sistema endógeno antioxidante (AA, α -TOH,...) (Rad•) por lo que la reacción con el oxígeno molecular para formar el anión superóxido y las otras sustancias prooxidantes (H_2O_2 , •OH) se vería claramente reducida. En los sistemas in vitro utilizados en nuestros experimentos para evaluar la actividad de las fracciones sobre la Hb no estuvieron presentes estos Rad• por lo que las fracciones polifenólicas generarían, como consecuencia, una mayor cantidad de anión superóxido y los radicales derivados (H_2O_2 , •OH) provocando el incremento de la velocidad de oxidación de la Hb con respecto a las muestras control. El orden de actividad prooxidante (IVH > IVU > IVP), coincidente con el orden de capacidad antiradicalaria y reductora, confirmaría el mecanismo anteriormente descrito ya que, una mayor capacidad de cesión electrónica y reductora, daría lugar a la formación de más especies superóxido y de los radicales con actividad prooxidante derivados de éste.

El estudio de los mecanismos responsables de la oxidación lipídica en músculo de

pescado es muy complejo debido a la gran cantidad de sustancias antioxidantes y prooxidantes presentes en la matriz que influyen en el proceso. La utilización de músculo lavado de pescado como sistema modelo presenta la ventaja de que se pueden controlar muchas de las variables con objeto de extraer conclusiones sobre el papel de diferentes sustancias pro- y antioxidantes en los mecanismos de oxidación. Por esta razón, este fue el sistema modelo elegido para estudiar la influencia de la Hb en la oxidación lipídica y de las fracciones polifenólicas sobre la actividad de la hemoproteína. Los primeros experimentos realizados con distintas concentraciones de Hb de jurel, demostraron la dependencia de la oxidación lipídica con la concentración de hemoproteína. Los resultados mostraron que el aumento de la cantidad de Hb sobre el músculo incrementó la velocidad formación de los productos primarios de la oxidación además de la cantidad máxima de peróxidos formados.

La adición de las distintas fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis inhibió la oxidación lipídica iniciada mediante la adición de Hb en músculo lavado de jurel. La actividad antioxidante relativa entre las distintas fracciones siguió el mismo orden de eficacia (IVH > IVU > IVP) que el observado en los experimentos descritos en el Capítulo 2.1. en sistemas modelo de músculo picado y no lavado. En este sistema, la oxidación fue iniciada mediante la actividad de todo el conjunto de sustancias prooxidantes, enzimáticas y no enzimáticas, presentes en el músculo post-mortem. Por lo tanto, el mecanismo antioxidante de las distintas fracciones estuvo gobernado por los mismos factores (a excepción de las interacciones con sustancias de carácter hidrofílico), independientemente de cómo haya sido iniciado el proceso oxidativo. Pazos, Lois, Torres & Medina (2006) obtuvieron los mismos resultados evaluando distintas fracciones procedentes de bagazo de uva sobre la oxidación en un sistema microsomial, iniciada mediante la adición de hierro enzimático y no enzimático.

La medida colorimétrica del parámetro a^* mostró un efecto protector de las fracciones sobre la autooxidación de Hb. Trabajos recientes llevados a cabo por nuestro grupo mostraron el incremento de la velocidad de oxidación de la hemoproteína en presencia de productos de la oxidación lipídica (peróxidos, aldehídos,...). La inhibición de la formación de estos productos debido a la actividad antioxidante de las fracciones polifenólicas reduciría, por tanto, la velocidad de oxidación de la Hb.

La adición de distintas cantidades de la fracción IVU sobre músculo lavado de jurel mostró la existencia de una relación entre concentración, en el rango 10-100 µg/g, efectividad antioxidante y descenso en la velocidad de formación de metHb. Los caracteres organolépticos (aroma y color) no fueron modificados como consecuencia de la adición de esta fracción en el

rango de concentraciones estudiado, lo que significa que podría ser añadida en la cantidad máxima ensayada, que se mostró como la más efectiva, sin provocar rechazo por parte del consumidor.

Los resultados obtenidos en los experimentos de Hb sobre músculo lavado, mostraron la existencia de una correlación entre oxidación lipídica y disminución de la intensidad de color rojo (parámetro a^*), medido mediante colorimetría. Esta correspondencia ya había sido señalada en diversas publicaciones (Richards & Li, 2004, Wetterskog & Undeland, 2004), por lo que este método podría utilizarse como una alternativa fácil, rápida y barata de seguimiento del deterioro oxidativo en músculo de pescado. Wetterskog & Undeland (2004) mostraron el incremento los valores del parámetro b^* en relación con la formación de productos terciarios de la oxidación lipídica o la formación de metHb. Estos autores afirman que se podría monitorizar la oxidación mediante medidas colorimétricas de una manera indirecta (mediante el seguimiento de la pérdida de Hb con el parámetro a^*) o directa (mediante el seguimiento de la formación de productos terciarios de la oxidación con el parámetro b^*). En nuestros experimentos realizados sobre músculo lavado no encontramos ningún tipo de correlación entre los parámetros b^* (intensidad de color amarillo) o L (luminosidad) y el desarrollo de la oxidación.

2.2.4. Conclusiones

- 1) Tanto el Caf-OH como la fracción IVU procedente de bagazo de uva interaccionaron con los componentes del sistema antioxidante endógeno α -TOH y AA. Ambos aditivos protegieron y regeneraron eficazmente el α -TOH endógeno del músculo de pescado. Por el contrario, la naturaleza de las interacciones con el AA fue diferente. Mientras que el Caf-OH fue regenerado por el AA, incrementando la velocidad de consumo del antioxidante endógeno en presencia del aditivo fenólico, la fracción IVU protegió el AA disminuyendo su velocidad de consumo con respecto a las muestras control. Las propiedades físico-químicas de ambos aditivos permitieron su localización en las interfases fosfolípido-agua, posibilitando el contacto con los componentes endógenos, tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica.
- 2) Los experimentos realizados en sistemas in vitro mostraron una gran dependencia entre la velocidad de autooxidación de la Hb y variables como el pH o la procedencia de la hemoproteína. Las distintas fracciones polifenólicas mostraron un carácter prooxidante, al contrario que lo observado sobre músculo de pescado, incrementando la velocidad de formación de metHb con respecto a soluciones de Hb sin aditivo.
- 3) Las fracciones procedentes de corteza de pino, bagazo de uva y corteza de Hamamelis inhibieron la oxidación lipídica inducida mediante la adición de Hb en músculo lavado de pescado. Mediante medidas colorimétricas se observó la disminución de la velocidad de autooxidación de la hemoproteína en presencia de las distintas fracciones. Los experimentos llevados a cabo con distintas concentraciones de fracción IVU demostraron que su eficacia fue proporcional a la cantidad añadida. En ningún caso se modificaron los parámetros organolépticos del alimento tras la adición de las fracciones, lo que resultó un factor muy importante desde el punto de vista de la aceptación por parte del consumidor.

2.3. BIBLIOGRAFÍA

- Almajano, M. P., Carbo, D. R., Delgado, M. E., & Gordon, M. H. (2007). Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J.Food.Sci.*, 72(5) C258-C263.
- AOCS (1989). *Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society*. D. Firestone. AOCS. Champain, IL.
- Aubourg, S. P. (1999). Recent advances in assessment of marine lipid oxidation by using fluorescence. *JAOCSJ. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(4), 409-419.
- Baron, C. P., & Andersen, H. J. (2002). Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J.Agric.Food Chem.*, 50(14), 3887-3897.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*, 37(8), 911-917.
- Bors, W., Michel, C., & Schikora, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*, 19(1), 45-52.
- Brown, W. D. (1961). Chromatography of myoglobin on diethylaminoethyl cellulose columns. *J. Biol. Chem.*, 236, 2238-2240.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In L. Packer, *Methods in Enzymology: Biomembranes. Specialized techniques*. (pp. 302-310). New York.: Academic Press.
- Buettner, G. A., & Jurkiewicz, B. A. (1996). Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid. In E. Cadenas, & L. Packer, *Handbook of antioxidants* (pp. 91-115). New York: Dekker.
- Burton, G. W., Webb, A., & Ingold, K. U. (1985). A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*, 20(1), 29-39.
- Cabrini, L., Landi, L., Stefanelli, C., Barzanti, V., & Sechi, A. M. (1992). Extraction of lipids and lipophilic antioxidants from fish tissues: A comparison among different methods. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 101(3), 383-386.
- Chan, S. H. (1987). *Autoxidation of unsaturated lipids*. London: Academic Press.
- Chapman, R. A., & Mackay, K. (1949). The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *JAOCSJ. Am. Oil Chem. Soc.*, 26, 360-363.
- Chen, J. H., & Ho, C. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J.Agric.Food Chem.*, 45(7), 2374-2378.

- Cheng, J., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. (2007). Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem.*, 104(1), 132-139.
- DOCE (1989). *Baremo de clasificación de frescura*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L5/21.
- Frankel, E. N. (1998). *Lipid Oxidation*. West Ferry, Dundee, Scotland: The Oily Press LTD.
- Fyhn, U.E.H., Fyhn, H.J., & Davis, B.J. (1979). Hemoglobin heterogeneity in Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62 A(1), 39-66.
- Gülçin, I., (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
- Herbes, S. E., & Allen, C. P. (1983). Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 40(8), 1315-1317.
- Iglesias, J., Pazos, M., Andersen, M. L., Skibsted, L. H., & Medina, I. (2009) Caffeic Acid as Antioxidant in Fish Muscle: Mechanism of Synergism with Endogenous Ascorbic Acid and α -Tocopherol. *J.Agric.Food Chem.* 57(2), 675-681.
- Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T., & Toyoda, M. (1999). Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. *Arch.Biochem.Biophys.*, 362(1), 79-86.
- Kortenska-Kancheva, V. D., Yanishlieva, N. V., & Kyoseva, K. S. (2005). Antioxidant activity of cinnamic acid derivatives in presence of fatty alcohol in lard autoxidation. *La Rivista italiana delle sostanze grasse*, 82(2), 87-92.
- Kristinsson, H. G., & Hultin, H. O. (2004). The effect of acid and alkali unfolding and subsequent refolding on the pro-oxidative activity of trout hemoglobin. *J.Agric.Food Chem.*, 52(17), 5482-5490.
- Laranjinha, J. (2001). Redox cycles of caffeic acid with α -tocopherol and ascorbate. *Methods Enzymol.*, 335, 282-295.
- Laranjinha, J., & Cadenas, E. (1999). Redox cycles of caffeic acid, α -tocopherol, and ascorbate: Implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *IUBMB life*, 48(1), 57-65.
- Laranjinha, J., Vieira, O., Madeira, V., & Almeida, L. (1995). Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: Consumption vs regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 323(2), 373-381.
- Larsson, K., Almgren, A., & Undeland, I. (2007). Hemoglobin-mediated lipid oxidation and compositional characteristics of washed fish mince model systems made from cod (*Gadus morhua*), herring (*Clupea harengus*), and salmon (*Salmo salar*) muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 55(22), 9027-9035.

- Lee, C., Krueger, C. G., Reed, J. D., & Richards, M. P. (2006). Inhibition of hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed fish muscle by cranberry components. *Food Chem.*, 99(3), 591-599.
- Liang, Y., Lin-shiau, S., Chen, C., & Lin, J. (1997). Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 67(1), 55-65.
- Liberto, M., & Cobrinik, D. (2000). Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate. *Cancer Lett.*, 154(2), 151-161.
- Lourenço, C.F., Gago, B., Barbosa, R.M., De Freitas, V., & Laranjinha, J. (2008). LDL isolated from plasma-loaded red wine procyanidins resist lipid oxidation and tocopherol depletion. *J.Agric.Food Chem.*, 56(10), 3798-3804.
- Mcdonald, R. E., & Hultin, H. O. (1987). Some Characteristics of the Enzymic Lipid Peroxidation System in the Microsomal Fraction of Flounder Skeletal Muscle. *J. Food Sci.*, 52(1), 15-21.
- Medina, I., Gallardo, J. M., González, M. J., Lois, S., & Hedges, N. (2007). Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 55(10), 3889-3895.
- Medina, I., González, M. J., Iglesias, J., & Hedges, N. D. (2009). Effect of hydroxycinnamic acids on lipid oxidation and protein changes as well as water holding capacity in frozen minced horse mackerel white muscle. *Food Chem.* 114(3), 881-888.
- Medina, I., Torres, J. L., & González, M. J. (2009) Impact of thermal processing on the activity of gallotannins and condensed tannins fo *Hamamelis Virginiana* used as functional ingredients in seafood. *J.Agric.Food Chem.*, (Enviado).
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M., & Scaccini, C. (1999). Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure- activity relation. *J.Agric.Food Chem.*, 47(4), 1453-1459.
- Nielsen, H. K., Loliger, J., & Hurrell, R. F. (1985). Reactions of proteins with oxidizing lipids. 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid losses in a whey protein-methyl linolenate model system. *Br. J. Nutr.*, 53(1), 61-73.
- Niki, E., Tsuchiya, J., Tanimura, R., & Kamiya, Y. (1982). Regeneration of vitamin E from α -chromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem. Lett.*, 11(6), 789-792.
- Ohara, K., Ichimura, Y., Tsukamoto, K., Ogata, M., Nagaoka, S., & Mukai, K. (2006). Kinetic study on the free radical-scavenging and vitamin E-regenerating actions of caffeic acid and its related compounds. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 79(10), 1501-1508.
- Pazos, M. (2005). Inhibición de la oxidación lipídica en el músculo de pescado mediante la utilización de polifenoles obtenidos a partir del bagazo de uva. Tesis doctoral. Santiago de Compostela, Universidad de Santiago de Compostela.

- Pazos, M., Andersen, M. L., Medina, I., & Skibsted, L. H. (2007). Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical. *J.Agric.Food Chem.*, 55(9), 3661-3666.
- Pazos, M., Alonso, A., Fernández-Bolaños, J., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Physicochemical properties of natural phenolics from grapes and olive oil byproducts and their antioxidant activity in frozen horse mackerel fillets. *J.Agric.Food Chem.*, 54(2), 366-373.
- Pazos, M., Lois, S., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *J.Agric.Food Chem.*, 54(12), 4417-4423.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.*, 92(3), 547-557.
- Pazos, M., González, M. J., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 220(5-6), 514-519.
- Pazos, M., Sánchez, L., & Medina, I. (2005). α -Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. *J.Agric.Food Chem.*, 53(10), 4000-4005.
- Plumb, G. W., De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., & Williamson, G. (1998). Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic.Res.*, 29(4), 351-358.
- Rey, A. I., Hopia, A., Kivikari, R., & Kahkonen, M. (2005). Use of natural food/plant extracts: Cloudberry (*Rubus Chamaemorus*), beetroot (*Beta Vulgaris* "Vulgaris") or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *LWT - Food Sci.Technol.*, 38(4), 363-370.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2003). Effects of added hemolysate from mackerel, herring and rainbow trout on lipid oxidation of washed cod muscle. *Fish. Sci.*, 69(6), 1298-1300.
- Richards, M. P., & Li, R. (2004). Effects of Released Iron, Lipid Peroxides, and Ascorbate in Trout Hemoglobin-Mediated Lipid Oxidation of Washed Cod Muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 52(13), 4323-4329.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contributions of Blood and Blood Components to Lipid Oxidation in Fish Muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 50(3), 555-564.
- Richards, M. P., Modra, A. M., & Li, R. (2002). Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Sci.*, 62(2), 157-163.
- Richards, M. P., Ostdal, H., & Andersen, H. J. (2002). Deoxyhemoglobin-Mediated Lipid Oxidation in Washed Fish Muscle. *J.Agric.Food Chem.*, 50(5), 1278-1283.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2000). Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: A possible role for deoxyhemoglobin. *J.Agric.Food Chem.*, 48(8), 3141-3147.

- Roginsky, V. A., & Stegmann, H. B. (1994). Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: Quantitative regularities. *Free Radic. Biol. Med.*, 17(2), 93-103.
- Shikama, K. (1998). The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle. *Chem. Rev.*, 98(4), 1357-1373.
- Sokal, R., & Rohlf, F. (1981). *Biometry*. San Francisco, CA: Freeman and Company.
- Stryer, L. (1988). Oxygen-transporting proteins: myoglobin and hemoglobin. In L. Stryer, *Biochemistry* (pp. 143-176). New York: Freeman and Co.
- Torres, J. L., Varela, B., García, M. T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J. J., Cascante, M., Sort, X., & Bobet, R. (2002). Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *J.Agric.Food Chem.*, 50(26), 7548-7555.
- Touriño, S., Lizárraga, D., Carreras, A., Lorenzo, S., Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Juliá, L., Cascante, M., & Torres, J. L. (2008). Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark: Electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chem.Res.Toxicol.*, 21(3), 696-704.
- Touriño, S., Selga, A., Jiménez, A., Juliá, D. L., Lozano, C., Lizárraga, D., Cascante, M., & Torres, J. L. (2005). Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and Antiproliferative effect in melanoma cells. *J.Agric.Food Chem.*, 53(12), 4728-4735.
- Undeland, I., Kristinsson, H. G., & Hultin, H. O. (2004). Hemoglobin-Mediated Oxidation of Washed Minced Cod Muscle Phospholipids: Effect of pH and Hemoglobin Source. *J.Agric.Food Chem.*, 52(14), 4444-4451.
- Vieira, O., Laranjinha, J., Madeira, V., & Almeida, L. (1998). Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation. Concerted antioxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *Biochem.Pharmacol.*, 55(3), 333-340.
- Vyncke, M. (1970). Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette Wiss Technol.*, 72(12), 1084-1087.
- Wetterskog, D., & Undeland, I. (2004). Loss of redness (a^*) as a tool to follow hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed cod mince. *J.Agric.Food Chem.*, 52(24), 7214-7221.
- Winterbourn, C. C. (1990). Oxidative reaction of hemoglobin. In L. Packer, & A. N. Glazer, *Methods in Enzymology. Oxygen radicals in biological systems*. (pp. 265-272). London: Academic Press.
- Zhou, B., Wu, L. M., Yang, L., & Liu, Z. L. (2005). Evidence for α -tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic.Biol.Med.*, 38(1), 78-84.



CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de AA y su forma oxidada, el DHAA en muestras de músculo de pescado. La derivatización con DMPD, la posterior extracción con isobutanol y la detección del derivado mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia permitió incrementar la sensibilidad y la selectividad con respecto a otras metodologías. Los análisis del contenido de AA y DHAA en distintas especies mostraron diferencias en la relación AA/DHAA, pudiéndose relacionar este índice con la susceptibilidad a sufrir procesos de oxidación lipídica.
- 2) Se han desarrollado distintas metodologías para la determinación de compuestos volátiles en emulsiones de aceite de pescado y músculo de pescado utilizando la SPME en modo espacio de cabeza como técnica de extracción y la GC-MS para la determinación cualitativa y cuantitativa de los analitos. El análisis, tanto en emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado, permitió correlacionar la formación de volátiles con el desarrollo del deterioro lipídico, estableciendo marcadores del proceso oxidativo en ambas matrices. La derivatización con PFBHA sobre la superficie de la fibra de SPME incrementó de manera notable la sensibilidad y selectividad en la determinación de los compuestos carbonílicos, permitiendo el análisis de volátiles asociados a diferentes procesos tecnológicos, no detectados mediante el método convencional sin derivatización.
- 3) Se ha demostrado la eficacia de ácidos fenólicos simples y procianidinas procedentes de residuos naturales para inhibir la rancidez, tanto en emulsiones de aceite de pescado como en músculo de pescado. El estudio de la actividad de ambas familias de antioxidantes permitió establecer relaciones entre sus estructuras y propiedades físico-químicas, y la efectividad para inhibir el deterioro lipídico.
- 4) Se ha profundizado en los mecanismos que rigen la interacción entre los antioxidantes añadidos y el balance oxidante/reductor endógeno del músculo de pescado. Los aditivos Caf-OH y fracción IVU mostraron un comportamiento diferente en sus interacciones con los componentes del sistema antioxidante endógeno del músculo, α -tocoferol y ácido ascórbico. El estudio de las interacciones entre las fracciones procedentes de residuos naturales y la Hb de pescado en sistemas in vitro mostró un incremento en la velocidad de formación de metHb tras la adición de las fracciones procianidínicas, mientras que en un sistema modelo de músculo lavado de pescado la velocidad de oxidación de la

Conclusiones generales

hemoproteína se vio claramente disminuida con respecto a los sistemas sin aditivo reduciendo, por tanto, su actividad prooxidante.

"La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad"

Gregorio Marañón (1887-1960)

